

MARIA CAROLINA ANDRADE NASCIMENTO

**PROTEÔMICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA EMBRIOGÊNESE EM
PUPUNHA (*Bactris gasipaes*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis,
2009

Nascimento, Maria Carolina

Proteômica e caracterização bioquímica da embriogênese em
Pupunha (*Bactris gasipaes*): UFSC, 2009.

84 p.

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

1. Pupunha, 2. Fisiologia do desenvolvimento, 3. Bioquímica vegetal,
4. Proteômica, 5. Embriogenese somática, 6. Embriogenese zigótica.

Ofereço

A Olavo, meu equilíbrio,
meu amor, minha paz.

Dedico

Aos meus pais,
Jane e Nélcio Nascimento,
por vossa confiança e carinho.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais, Jane e Nélío Nascimento, e meus irmãos Matheus, Ana Luiza, Lucas e Gabriel, que sempre confiaram nos meus sonhos e me deram forças para seguir em frente.

A Olavo Gavioli, a quem ofereço esse trabalho, por sempre estar me apoiando, acreditando na minha capacidade e me trazendo muitas alegrias.

A George, Iolanda e Fernanda Gavioli, minha segunda família, pelo carinho e atenção.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Miguel Pedro Guerra com grande admiração, por toda confiança, atenção e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Rubens Onofre Nodari, Dr. Aparecido Lima, e ao pesquisador Dr. Mario Vidor, por aceitar tão gentilmente fazer parte da banca desse trabalho.

A professora Dra. Eny I. S. Fhoh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas da Universidade de São Paulo que permitiu a realização das análises bioquímicas realizadas neste trabalho.

Ao Sr. Carlos Toledo, pelo material vegetal fornecido para realização desse projeto.

Aos meus amigos, Alan David Claumman, Clarissa Caprestano e Neusa Steiner, cuja ajuda foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética vegetal, pela amizade e convivência.

Ao meu colega “virtual” e apaixonado pela pupunha Douglas Steinmacher, pelos conselhos e colaborações.

Ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de realização deste trabalho e pela confiança depositada.

A Capes pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação meus sinceros agradecimento.

Sumário

Lista de abreviaturas	1
Lista de tabelas.....	2
Lista de figuras.....	2
CAPITULO I –Estado da arte e situação do problema.....	4
1-Introdução.....	5
2-Objetivos.....	14
2.1- Objetivo Geral.....	14
3- Referências Bibliográficas.....	15
CAPITULO II – Análises Bioquímicas e fisiológicas de calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>).....	25
1- Resumo.....	26
2- Abstract.....	27
3- Introdução.....	28
3.1- Objetvos específicos.....	30
4-Material e Métodos.....	30
4.1- Material Vegetal.....	30
4.2- Meio de cultura para indução de calos e condições de cultivo.....	31
4.3- Extração e quantificação de ABA e AIA.....	31
4.4- Extração e quantificação de poliaminas.....	32
4.5- Extração e quantificação de aminoácidos.....	34
4.6- Extração e quantificação de fenóis totais.....	34
5- Análises estatísticas.....	35
6- Resultados e Discussão.....	35
6.1- Níveis endógenos de AIA e ABA.....	35
6.2- Poliaminas endógenas.....	38
6.3- Aminoácidos.....	42
6.4- Fenóis totais.....	44
7- Conclusões.....	46
8-Referências Bibliográficas.....	48
CAPITULO III – Proteômica durante a embriogênese somática e embriões zigóticos de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>).....	52
1- Resumo.....	53
2- Abstract.....	54
3- Introdução.....	55
4- Material e Métodos.....	58
4.1- Material vegetal.....	58
4.2- Indução a embriogênese somática.....	58
4.3- Extração das proteínas solúveis.....	58
4.4- Quantificação das proteínas.....	59
4.5- Eletroforese Bidimensional (2DE).....	59
4.6- Análise dos géis.....	60
5- Resultados e Discussão.....	61
5.1- Perfil protéico de calos embriogênicos e não embriogênicos.....	61
5.2- Perfil protéico em diferentes estádios da calogênese.....	67
5.3- Perfil protéico do embrião zigótico e endosperma.....	74
6 Conclusão.....	79
7- Perspectivas Futuras.....	80
8- Referências Bibliográficas.....	81

Lista de abreviaturas

2-DE- Eletroforese Bidimensional
ABA- Ácido abscísico
ADC- Arginina descarboxilase
AIA- Ácido indol-acético
CCA- Centro de Ciências Agrárias
CE- Calos embriogênicos
CNE-Calos não embriogênicos
CHAPS-3[(3-cholamidopropyl)dimethylamino]- 1 propanesulfonate
DNA-Ácido desoxiribonucleico
DTT- Ditiotritol
EZ- Embrião Zigótico
EDTA- Ácido etilenodiamino Tetra-acético
H- Horas
HCL- Ácido clorídrico
IEF- Focalização isoeletrica
IPG- Gradiente de pH imobilizado
MF- Massa fresca
Min- Minuto
MS- meio de cultura proposto por Murashige e Skoog
MS/MS- Espectrometria de massa
ODC- Ornitina descarboxilase
PAs- Poliaminas
PCA- Ácido pérclorico
Pd- Padrão de peso molecular
pI- Ponto isoeletrico
PM- Peso molecular
Put- Putrecina
Rpm- Rotação por minuto
SDS- Dodecil sulfato de sódio
Spd- Espermidina
Spm- Espermina
TCL- Camada fina de células
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina
USP- Universidade de São Paulo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Razão AIA/ABA nos calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*).....38

Tabela 2.2 Aminoácidos livres ($\mu\text{g/g}$ de MF) em calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha (*Bactris gasipaes*).....44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Aspectos gerais da pupunha (*Bactris gasipaes*) A- Planta adulta apresentando vários perfilhos B- Cachos de frutos de pupunha e aspectos dos frutos.....05

Figura 2.1 Concentração de hormônios endógenos em calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) A- Concentração média de AIA no calo embriogênico (CE) e no calo não embriogênico (CNE). (média \pm desvio padrão, $n=3$).36

Figura 2.2- Concentração média de ABA nos calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha (média \pm desvio padrão, $n=3$).....37

FIGURA 2.3 - Poliaminas endógenas em calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*) **A** - Poliaminas endógenas livres. **B** - Poliaminas endógenas conjugadas, **C** - Poliaminas endógenas totais. **D** - Razão de Put/(Spd+Spm) em calos embriogênicos e não embriogênicos. (média \pm desvio padrão, $n=3$).....41

Figura 2.4 Fenóis totais em calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*) (média \pm desvio padrão, $n=3$).....45

Figura 2.5- Aspectos gerais de calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) **A**- Calo embriogênico. **B**- Calo não embriogênico.....45

Figura 3.1- Etapas da análise proteômica em plantas, usando a interface eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa MS/ MS.....57

Figura 3.2 – Calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) **Setas pretas**- calos com competência embriogênica **Setas Brancas**- Calos sem competência embriogênica...63

FIGURA 3.3– Perfil protéico de calos de pupunha. (*Bactris gasipaes*) **A**- Perfil protéico de calos embriogênicos **B**- Perfil protéicos de calos não embriogênicos.....64

FIGURA 3.4 – **A**- Proteínas totais ($\mu\text{g/mg}$ MF) nos dois tipos de calos: embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) **B**- Distribuição dos pI das proteínas expressas em calos embriogênicos e não embriogênicos **C**- Distribuição dos PM das proteínas expressas em calos embriogênicos e não embriogênico.....65

Figura 3.5 – Número de proteínas exclusivas de calos embriogênicos, exclusivas de calos não embriogênicos e comuns em ambos os calos.....66

Figura 3.6- Diferença de expressão das proteínas comuns em calos embriogênicos versus não embriogênicos de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>).....	66
Figura 3.7- Diferentes estádios da calogenese de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>). A- Embrião zigótico B- Embrião zigótico com 15 dias de cultivo C – Calos com 30 dias de cultivo D- Calo não embriogênico com 60 dias de cultivo.....	70
Figura 3.8- Perfil protéica dos diferentes estádios da calogenese de pupunha A- Embrião zigótico B- 15 dias de cultivo C- 30 dias de cultivo D- 60 dias de cultivo.....	71
Figura 3.9- A- Proteínas totais (ug/mg MF) nos diferentes estádios da calogenese C- Distribuição dos PM das proteínas expressas nos diferentes estágios da calogenese. (EZ, 15, 30 e 60 dias de cultivo).....	72
Figura 3.10– Número de proteínas exclusivas e constantes durante os diferentes estádios da calogenese em pupunha.....	73
Figura 3.11 - Representação gráfica das modificações dos volumes dos spots em resposta ao desenvolvimento da calogenese. Em verde os spots que diminuem e em vermelho os que aumentam em relação ao estágio anterior.....	73
FIGURA 3.12- Perfil protéico das proteínas expressas no embrião zigótico(A) e no endosperma(B) de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>).....	76
FIGURA 3.13 – A- Proteínas totais (ug/mg MF) em embriões zigóticos (EZ) e endosperma de pupunha. B- Distribuição dos pl das proteínas expressas no embrião zigóticos e endosperma. C- Distribuição dos e PM das proteínas expressas no embrião zigótico e no endosperma.....	77
Figura 3.14 – Número de proteínas exclusivas de embrião zigótico, exclusivas de endosperma e comuns em embrião zigótico e no endosperma de pupunha.....	78
Figura 3.15- Diferença de expressão das proteínas comuns em embrião zigótico versus endosperma de pupunha.....	78

CAPITULO I

ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA

1. Introdução

A palmeira *Bactris gasipaes* (Kunth – Arecaceae) é nativa do trópico úmido americano, mais especificamente da bacia Amazônica e é conhecida popularmente no Brasil como pupunha ou pupunheira (Clement et al.,1988).

Trata-se de uma palmeira cespitosa que pode atingir 20m de altura, com diâmetro do caule variando de 15 a 30 cm e o comprimento dos entrenós de 2 a 30 cm. Os entrenós apresentam inúmeros espinhos rígidos, em tons de cores variando entre o preto ou o marrom escuro, entretanto, existem mutações sem espinho, selecionadas pelos ameríndios em diversas áreas de ocorrência da espécie. O ápice da estipe sustenta uma coroa formada por 15 a 25 folhas pinadas, com folíolos inseridos em diferentes ângulos. A inflorescência monóica aparece nas axilas das folhas senescentes. Após a polinização, os cachos podem conter entre 50 a 1000 frutos e pesar até 25Kg. Os frutos individuais pesam entre 10 e 25 g e quando maduros possuem um epicarpo fibroso que varia de cor, podendo ser vermelho, laranja ou amarelo, e um mesocarpo amiláceo ou oleoso e úmido, com endocarpo envolvendo um endosperma compacto e oleoso (Clement, 1987).



Figura 1- Aspectos gerais da pupunha (*Bactris gasipaes*) A- Planta adulta apresentando vários perfilhos B- Cachos de frutos de pupunha e aspectos dos frutos.

O Brasil é o maior produtor mundial de palmito, com 90% da produção proveniente do extrativismo de populações naturais de juçara (*Euterpe edulis*) e açaí (*Euterpe oleraceae*) (Chaimsohn, 2001). No entanto ele não possui mais o título de maior exportador, o que ocorria na época em que exportava menos de 10% de sua produção. A perda deste mercado internacional deve-se a baixa qualidade dos palmitos brasileiros e por ser um produto não ecológico, pois é sustentado pelo corte de palmeiras nativas (Resende et al., 2004)

Devido à necessidade de armazenamento dos frutos pelos ameríndios nas épocas de estiagem foi realizada uma seleção de plantas e, assim, um início da domesticação da espécie. Durante o decorrer dos séculos, a pupunha tornou-se a única palmeira domesticada nas Américas, resultando em grande diversidade, vários nomes da planta, diversos tamanhos e composição dos frutos além de suas inúmeras utilidades (Clement, 1987; 1988; 1990).

No norte da América do Sul numerosas espécies do gênero *Bactris* são usadas ocasionalmente para o consumo de seus frutos comestíveis, porém nenhuma delas atingiu a importância alimentar da pupunha (Clement, 1987). Pelo valor nutricional do fruto e a variedades de alimentos obtidos a partir dela essa palmeira era um dos produtos alimentícios básicos para muitas comunidades de ameríndios da América Central e do Sul (Clement, 1988).

Diversas são as utilizações para esta espécie. Seu principal uso, inicialmente foi associado ao consumo de seu fruto amiloso na forma cozida (para consumo direto), fermentado para fazer chicha (bebida alcoólica) ou moído e seco para fazer farinha (Clement et al., 1988).

Sua madeira, dura e resistente a intempéries, quando beneficiada é usada na fabricação de instrumentos musicais, cabos de ferramentas, pisos, peças de artesanato, produção de celulose para papel e também pode ser transformada em celofane e rayon (Mora-Urpi et al., 1984; Couto et al., 1999; Chaimsohn, 2001).

As inflorescências são utilizadas em alguns países para o consumo humano como saladas e condimento; o pólen é empregado na apicultura e consumo humano (Couto et al., 1999); raízes são usadas na medicina popular como lenitivo para dores de cabeça e desarranjos intestinais além do preparo de vermífugos. As folhas podem ser usadas para confecção de artesanato, em cobertura de habitações e para a alimentação animal, sendo uma fonte adicional de proteína, apresentando, em média, 7,5% de proteína bruta (Couto et al., 1999; Chaimsohn, 2001).

Seu fruto apresenta um alto conteúdo nutricional, é rico em proteínas e lipídeos, possui quantidade razoável de caroteno e amido, sendo de especial importância o alto valor de vitamina A e ácido ascórbico (Camacho, 1969; Clement, 1987). Dos frutos obtêm-se diversos produtos: farinha para alimentação animal ou humana (Clement, 1987); vinho, licor, sorvete e doce em pasta ou em compota (Couto et al., 1999; Kulchetscki et al., 2001). Frutos verdes são enlatados na forma de picles, tostados semelhantes a castanhas e moídos ou granulados (Kulchetscki et al., 2001). Outra utilização que se dá aos frutos é a produção de óleo para alimentação humana. Segundo Hartley (1977), o óleo de pupunha contém maior quantidade de ácidos graxos insaturados do que o azeite-de-dendê. Atualmente, o óleo insaturado possui excelente valor de mercado, sendo interessante no ponto de vista nutricional e industrial (Chaimsohn, 2001).

No entanto apesar das qualidades presente nos frutos da pupunha, sua utilização não tem despertado o interesse econômico industrial resultando apenas no consumo em mercados regionais (Clement et al., 2004), sendo o palmito o principal motivo de seu plantio em larga escala.

Com a crescente preocupação mundial no sentido de promover a preservação dos recursos naturais, o Brasil se vê obrigado a adotar formas de exploração de seus recursos de modo a garantir a sustentabilidade de seu patrimônio ambiental. Com a realização da Conferência Mundial das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO 92), na qual os países participantes assinaram um acordo se comprometendo a importar e exportar palmito proveniente de plantações, os pesquisadores começaram a estudar a viabilidade do plantio de *Bactris gasipaes* Kunth. (Guerreiro, 2002).

O cultivo da pupunha para produção de palmito vem expandindo desde 1990, despertando nos últimos anos o interesse de agricultores de todo país devido às características de precocidade sobre as tradicionais espécies produtoras de palmito *Euterpe edulis* Mart. e *E. oleracea* Mart. A pupunha pode ter seu primeiro corte aos 1,5 a 2 anos e apresenta perfilhamento (Villachica, 1996; Mora-Urpí et al., 1997; Bovi, 1998). Agrega-se a estas características a boa palatabilidade, cor, formato, ausência de princípios tóxicos, rendimento e facilidade de extração. Adicionalmente, o palmito desta espécie apresenta baixa atividade de enzimas peroxidase e polifenoloxidase, o que possibilita a sua comercialização *in natura*, abrindo novos nichos de mercado (Clement et al., 1999).

Usualmente a pupunha é propagada por sementes, obtendo-se uma grande quantidade de mudas com menor custo, ou por perfilhos, embora estes apresentem dificuldade de enraizamento (Nogueira et al., 1995; Villachica, 1996). Mudas obtidas por meio de sementes apresentam desenvolvimento lento e desuniforme, uma vez que algumas sementes completam a germinação aos 150 dias (Nogueira et al., 1995) prolongando o período de formação de mudas. A viabilidade e o vigor das sementes estão associados com a perda da umidade e, partindo-se de um teor de umidade inicial de 45%, observou-se que abaixo de 38% a emergência e o vigor das sementes são afetados negativamente. Abaixo de 17% de umidade a emergência é praticamente nula, o que caracteriza que as sementes de pupunha são recalcitrantes (Ferreira e Santos, 1992; Bovi et al., 2004). Isto dificulta a execução de programas de conservação em longo prazo e que se baseiam na desidratação da semente para armazenamento (Chin e Roberts, 1980).

Não obstante, mesmo a pupunha apresentando um caráter perene, há ocorrência de partenocarpia e polinização deficiente, resultando na formação de cachos com poucos frutos com sementes variáveis (Almeida, 1994). Desta maneira técnicas de micropropagação se configuram como alternativas não somente para a produção massal de mudas, como também para a obtenção de clones de matrizes selecionadas, adaptadas as mais diversas regiões de cultivo já que na propagação por sementes dessa espécie as características da mãe não são necessariamente mantidas, uma vez que ocorre segregação resultante da fecundação cruzada.

A técnica de micropropagação mais utilizada em palmeiras é a embriogênese somática. Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, entre elas à possibilidade de selecionar genótipos superiores para uma subsequente automação dos clones produzidos, obtenção de grande número de propágulos e menor incidência da variação somaclonal, além de baixar os custos por unidades produzidas, produzir embriões somáticos de forma sincronizada e com alto grau de uniformização (Guerra et al., 1999).

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas isoladas, ou pequenos grupos destas sofrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que resultam na formação de embriões somáticos, sendo um processo biológico análogo a embriogênese zigótica e que expressa a totipotencialidade das células vegetais (Ammirato, 1983; Guerra et al., 1999; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Esta rota morfogenética *in vitro* possui aplicações importantes para a multiplicação

massal de genótipos superiores e também na obtenção de sistemas biológicos referência para os estudos de fisiologia, bioquímica, moleculares e morfogenéticos do desenvolvimento embrionário (Guerra et al., 1999; Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Em geral a aquisição da competência embriogênica depende da interação de fatores internos, como genótipo, idade de explante, condições fisiológicas e fatores externos como luz, temperatura, reguladores de crescimento e presença de compostos antioxidantes (Jimenez, 2005). Esta aquisição é considerada um fator crítico no processo de embriogênese somática e é altamente dependente da divisão e desdiferenciação celular (Fehér et al., 2003; Steinmacher, 2005).

Há dois padrões básicos na expressão da embriogênese somática (Sharp et al., 1980). O primeiro corresponde ao modelo direto no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos. Este padrão ocorre, por exemplo, em células nucelares de variedades poliembriônicas de citros (Sharp et al., 1982), em embriões imaturos de *Malus pumila* (James et al., 1984), das palmeiras *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1988) e em inflorescências jovens de *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1991).

Já o segundo padrão corresponde ao modelo indireto nos quais os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação. Estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Guerra et al., 1999).

Nesse modelo indireto dois tipos de calos morfologicamente distintos, podem ser formados, os calos embriogênicos e os não embriogênicos. Os calos embriogênicos são capazes de desenvolverem em embriões somáticos sem estímulos externos, enquanto que os não embriogênicos não apresentam este potencial.

A regeneração *in vitro* de plantas de pupunha foi descrita pela primeira vez por Huete e Arias (1981) a partir da organogênese indireta e, posteriormente, por organogênese direta (Pinedo, 1987; Almeida e Kerbauy, 1996) e embriogênese somática (Stein e Stephens, 1991; Valverde et al., 1987).

No âmbito do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, as pesquisas com a micropropagação desta espécie iniciaram em meados da primeira década de 2000. Trabalhos pioneiros realizados por Steinmacher et al. (2007 a,b,c) possibilitaram a indução da embriogênese somática em pupunha utilizando diferentes fontes de explantes: embriões zigóticos maduros, inflorescências

juvenis e meristemas apicais. Um protocolo completo de regeneração *in vitro* representando a primeira etapa para o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a sua micropropagação a partir de embriões zigóticos foi desenvolvido. Os principais fatores que afetaram as respostas a embriogênese foram os reguladores de crescimento (Steinmacher et al., 2007a). Quando inflorescências juvenis foram utilizadas como fonte de explante observou-se uma taxa de embriogênese somática relativamente baixa, mas os embriões formados apresentavam uma maior capacidade de conversão (Steinmacher et al., 2007b). Por sua vez, quando ápices caulinares foram utilizados com fonte de explante por meio da técnica de *thin cell layer* (TCL) foi possível estabelecer um protocolo completo de embriogênese somática (Steinmacher et al. 2007c). Um aspecto positivo deste protocolo é sua aplicação para a propagação clonal massal, uma vez que os explantes são de origem somática.

Ainda de acordo com Steinmacher et al., (2007a), o sistema regenerativo *in vitro* da pupunha se enquadra no modelo indireto, com formação de calos intermediários; contudo, observa-se uma baixa taxa de indução de calos com competência embriogênica (10 – 25%).

As pesquisas com embriogênese somática têm sido associadas principalmente à elucidação de aspectos da fisiologia ou de suas aplicações para a propagação e o melhoramento de plantas. A partir de estudos pioneiros realizados sobre a embriogênese somática *in vitro* por Steward et al. (1958) os esforços foram direcionados para a identificação dos vários fatores que controlam esta rota morfogênica em diferentes espécies (Guerra et al., 1999; Dal Vesco e Guerra 2001). Por outro lado, os mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam a embriogênese somática ainda são pouco conhecidos.

Recentemente estudos em níveis moleculares, como aqueles relacionados com a proteômica vêm sendo realizados. Isto possibilita a descrição de mudanças ocorrida na expressão diferencial de produtos gênicos devido à alteração das condições de cultivo (Lippert et al., 2005).

Proteoma representa o conjunto de proteínas que são expressos em um conjunto de células específicas, tecidos ou órgãos em um determinado momento. A proteômica permite avaliar várias propriedades das proteínas, tais como o perfil das modificações pós-tradução ou interação com outras biomoléculas. Um dos objetivos mais comuns dos estudos contemporâneos é a caracterização das diferenças entre os níveis de expressão das proteínas em diferentes tecidos (Fitzgerald, 2001).

A proteômica apresenta duas abordagens. A primeira é uma abordagem sistemática e consiste no estudo global da expressão das proteínas de uma determinada célula referente a um estado fisiológico. Essas informações podem ser úteis em bancos de dados. A segunda é uma abordagem pragmática e consiste em estabelecer mapas bidimensionais da expressão celular em determinadas condições permitindo o estudo de rotas celulares e suas modificações por drogas e estímulos biológicos com subsequente identificação de proteínas alvos. No entanto ambas as abordagens são complementares e fornecem uma visão global da fisiologia celular (Blackstock e Weir, 1999; Haynes et al., 1998).

Estudos nesse sentido foram feitos com diversas espécies, detectando variações nos níveis de expressão de determinadas proteínas, em diferentes condições de cultivo como em *Medicago truncatula* (Imin et al., 2004, 2005), *Picea glauca* (Lippert et al., 2005), *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al., 2006) e *Vitis vinifera* (Milena et al., 2008). Em embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* foram detectadas 74 proteínas com diferença de expressão nos estádios de desenvolvimento destes embriões (Cangahuala-Inocente et al., 2009).

O conhecimento da regulação de proteínas e quais proteínas são expressas é de fundamental importância para um melhor entendimento dos processos que desencadeiam o desenvolvimento do embrião e servem para promover uma renovação tanto da investigação da biologia desses processos complexos quanto para gerar oportunidades para novas pesquisas (Lippert et al., 2005).

Estudos bioquímicos, morfológicos e histológicos também estão sendo realizados durante a embriogênese somática em diferentes plantas, proporcionando uma grande quantidade de informações, incluindo aquelas associadas às alterações bioquímicas precoces relacionadas com a indução da competência embriogênica por auxinas (Komamine et al., 1991), acúmulos de poliaminas (Bajaj e Rajam 1996) e maior acúmulo de proteínas em calos embriogênicos ou não embriogênicos (Hahne e Lörz, 1988).

De acordo com Kumria et al., (2003), dentre os muitos aspectos ainda não elucidados e relacionados à embriogênese somática, cita-se a participação de hormônios e de reguladores de crescimento da planta para determinar a conversão de tecidos somáticos embriogênicos e permitir a progressão e a maturação de embriões somáticos (Jiménez, 2005).

A sensibilidade às auxinas pode explicar, ao menos parcialmente, diferenças na resposta entre as espécies de plantas, genótipos ou células em mesmos explantes ou em explantes de diferentes origens em sua potencialidade de se transformar em embriogênicas (Dudits et al., 1995). As divergências na sensibilidade são consequência da variação na habilidade de determinados explantes produzirem os receptores apropriados e, assim, continuarem com o padrão de desenvolvimento da embriogênese (Guzzo et al., 1994).

A necessidade de auxinas na embriogênese somática foi estabelecida para diversas plantas. Exemplos de culturas embriogênicas que têm índices mais elevados de auxinas endógenas que suas contrapartes não embriogênicas podem ser encontrados em cenoura (Sasaki et al., 1994; Jiménez e Bangerth, 2001a), *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran et al., 1987), *Medicago falcata* (Ivanova et al. 1994), cana-de-açúcar (Guiderdoni et al., 1995), trigo (Jiménez e Bangerth, 2001b) e milho (Jimenez e Bangerth, 2001c).

Relatos em anis (Ernst e Oesterheld, 1985) e em uva (Jimenez e Bangerth, 2000) indicam que os níveis de citocininas podem estar mais relacionados ao crescimento de calos das culturas que na competência da embriogênese. Em *Medicago arborea* foram observados teores de citocininas mais elevados em calos não embrionários que em calos embrionários (Pinto et al., 2002).

Os teores endógenos do ácido abscísico parecem ser significativos para a iniciação de culturas embrionárias, especialmente em algumas monocotiledônes (Bhaskaran e Smith, 1990) e também em cenoura (Kiyosue et al., 1992). Assim, observaram-se teores mais elevados deste hormônio em calos embriogênicos de cenoura, quando comparados aos não embriogênicos (Jimenez e Bangerth, 2001a), em cana de açúcar (Guiderdoni et al., 1995) e em uva (Jimenez e Bangerth, 2000). Entretanto, em *Hevea brasiliensis* (Etienne et al., 1993) e em alfafa (Ivanova et al., 1994), as culturas de calos embrionários acumularam menores teores de ácido abscísico que suas contrapartes não embriogênicas.

O primeiro relato do papel das PAs na embriogênese somática foi dado por Montague et al (1979). Desde então vários estudos tem sido realizados visando à mudança nos níveis celulares de poliaminas durante a embriogênese somática em tecidos de plantas.

Poliaminas (PAs) são compostos presentes em todas as células eucariotes (Heby e Persson 1990), ocorrendo na forma livre ou conjugados com compostos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular, ou então ligados a macromoléculas e à parede celular (Galstone e Kaur-Sawhney 1990, Bajaj e Rajam 1996, Aribaud et al., 1999). Nas plantas, PAs são sintetizadas em grandes quantidades nos tecidos jovens e também estão presentes em níveis elevados em sementes quiescentes de diferentes espécies (Santanen e Simola 1999). As PAs são consideradas como uma nova classe de reguladores de crescimento, mensageiros secundários, e uma das reservas de carbono e nitrogênio na cultura de tecidos (Flores e Filner 1985, Altman e Levin 1993 e Kakkar et al., 2000).

As PAs putrecina (Put) espermidina (Spd) e espermina (Spm), são amplamente distribuídas na natureza, desempenhando importante papel em vários eventos celulares, tais como síntese protéica, replicação do DNA e morfogênese (Tabor e Tabor, 1984 e Bachrach, 1973).

A regeneração de plantas por meio da embriogênese somática é um importante e potencial sistema modelo para o estudo de eventos regulatórios. As PAs podem modular a expressão gênica atuando como sinalizadoras (Hiraga et al., 2000; Yamasaki e Cohen, 2006). Pedroso et al. (1997) mencionou a participação da Put e Spd nas primeiras fases da embriogênese somática. Ahmadabadi et al. (2007) relataram que Spm e Spd desempenharam papéis críticos na indução de calos. Em *Allium cepa*, a adição de Put e Spd promoveu a indução de embriões somáticos, enquanto que a presença, apenas de Spd estimulou a maturação e a conversão de embriões em plantas (Martínez et al., 2000). Em *Daucus carota* a Spm estimulou a formação de embriões somáticos (Takeda et al., 2002). Shoeb et al. (2001), propuseram que não apenas o conteúdo de PAs mas também a relação Put/Spd, constituem importantes biomarcadores da capacidade regenerativa em plantas. Além disto, os perfis de PAs podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a maturação das culturas embriogênicas (Kong et al., 1998).

Os aminoácidos também têm se mostrado como reguladores morfogenéticos em vários sistemas *in vitro* (Tupy et al., 1983; Kobayashi et al., 1999). Pesquisadores com frequência têm suplementado os meios de cultura com aminoácidos ou proteínas hidrolisadas com intuito de favorecer o desenvolvimento das culturas *in vitro*, embora alguns aminoácidos sejam inibitórios (Gamborg, 1970).

Diferenças no “pool” de aminoácidos endógenos podem afetar a taxa de síntese de proteínas durante a embriogênese (Wetherell e Dougall, 1970; Kamada e Harada, 1984), a germinação de sementes (Aguilar e Sanches, 1984) e a organogênese (Zhu et al., 1990)

Em culturas de *Brassica juncea* a aplicação de aminoácidos como a metionina e a treonina aumentavam a proliferação celular enquanto que leocina e isoleucina promoviam a diferenciação. Outros estudos demonstraram a estimulação da embriogênese somática em resposta à adição de aminoácidos exógenos com L-prolina, L-leocina e a L-glutamina ao meio de cultura (Rochi et al., 1984)

Outros compostos que influenciam a resposta a embriogênese somática são os compostos fenólicos. Alguns trabalhos relataram a correlação entre a presença de compostos fenólicos específicos e a indução de células embriogênicas (Ishikura e Teramoto, 1983; Karting et al., 1993; Alemanno et al., 1994; Cvikrova et al., 1996; Lozovaya et al., 1996; El Bellaj and El Hadrami, 1998; El Bellai et al., 2000; Malabadi and Nataraja, 2003; Kouakou et al., 2004).

Diante disso, a necessidade de serem identificados marcadores bioquímicos, fisiológicos e genéticos para a identificação precoce das células competentes à embriogênese somática tem sido uma das principais preocupações dos investigadores (Swarnkar et al., 1986; Wann et al., 1987; Rao et al., 1990 e Kouakou et al., 2007).

2. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos moleculares bioquímicos e fisiológicos associados à embriogênese da pupunha (*Bactris gasipaes*).

Referências Bibliográficas

- AGUILAR, R. e DE SANCHEZ, J. E. Aminoacid pools and protein synthesis in germinating maize embryos. **Plant Cell Report**, v. 3, p. 193– 195, 1984.
- AHMADABADI, A.; RUF, S; BOCK R. A leaf – based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**. V. 16, p. 437-448, 2007
- ALEMANNO, L.; BERTHOULY, M.; ANDARY, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Polyphenolic metabolism at the explant level during *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. In: IAPTC. International congress of plant tissue and cell culture, Firenze, Italia, 12-17 June. 1994.
- ALMEIDA, M. Emprego de Cultura “*in vitro*” para multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K) Palmae. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo)**, 75p., 1994.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (Palmae) through flower but culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8(03), p. 215-217, 1996.
- ALTMAN, A. & LEVIN, N. Interaction of polyamines and nitrogen nutrition in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 653-658, 1993.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: D. A. Evans, W.R. Sharp, P. V. AMMIRATO, e Y. YAMADA (eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**, Macmilian Publisher Co., New York, p. 82 – 123, 1983.
- ARIBAUD, M., KEVERS, C., MARTIN-TANGUY, J. & GASPARD, T. Low activity of amine-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organic programs in *Chrysanthemum* leaf disc explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 85-94, 1999.
- BACHRACH, U. Function of naturally occurring polyamines. **New York: Academic Press**, 1973
- BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. Restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. **Plant Physiology** v. 112, p. 1343–1348, 1996.
- BHASKARAN S.; SMITH R. H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science**, v. 30, p. 1328–1337, 1990.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and phisical mapping of cellular proteins. **Treds Biotechnology**, v. 17, p. 121-127, 1999.
- BOVI, M. L. A. **Palmito pupunha: informações básicas para cultivo**. Campinas, Instituto Agronômico, 1998. 50 p. (Boletim Técnico 173).

BOVI, M. L. A. MARTINS, C. C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quarto lotes de pupunheira: efeito sobre a germinação e vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.1, p. 109-112, 2004.

CAMACHO, V. El Pejibaye como um alimento potencial de grand importância para las familias campesinas de los Trópicos americanos. **Proceedings of the American Society of the Horticultural Science**, v. 13, p. 275-84, 1969.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogenese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* O. Berg Burret)** 2007 237p , Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Florianópolis:UFSC.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryos of *Feijoa sellowiana*. **Protoplasma**. V. 224, p. 33–40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCE, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos **Acta Physiology Plant** DOI 10.1007/s11738-008-0259-y 2009.

CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H. **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical, 152p, 1980.

CLAPAROLS, I.; SANTOS, M. A.; TORNE, J. M. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 1–11. 1993.

CLEMENT, C. R. Pupunha, uma árvore domesticada. **Ciência hoje**, v. 5(29), p. 42-49, 1987.

CLEMENT, C. R.; CHÁVEZ FLORES, W. B.; MOREIRA GOMES, J. B. Considerações sobre a pupunha como produtora de palmito. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM PALMITO, 1988, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CNPF IAPAR IAC, p. 225-247, 1988.

CLEMENT, C. R. Domestication of the pejobaye palm (*Bactris gasipaes*): past and present. **Advances in Economic Botany**, v. 6, p. 155-174, 1988.

CLEMENT, C. R. Regeneração natural de pupunha. **Acta Amazonica**, v. 20, p. 399-403, 1990.

CLEMENT, C. R.; SANTOS, L.A.; ANDRADE, J.S. Conservação de palmito de pupunha em atmosfera modificada. **Acta Amazônica**, v. 29(3), p. 437-445, 1999.

WANN, S. R.; JOHNSON, M. A.; NOLAND, T. L.; CARLSON, J. A. Biochemical difference between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Report**, v. 6, p. 39-42, 1987.

CLEMENT, C. R.; WEBER, J. C.; van LEEUWEN, J. DOMIAN, C. A.; COLE, D. M.; LOPES, L.A.A.; ARGUELO, H. Why extensive research and development did not promote use of peach palm fruit in Latin America. **Agroforestry Sytems**, v. 61, p. 195-205, 2004.

CHAIMSOHN, P. F. Cultivo de pupunha para palmito. Importância, Mercado e aspectos biológicos e agrônômicos. **In: Curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito de pupunha**, IAPAR Londrina, p. 7-69, 2001.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, p. 1494–1499, 1993.

COUTO, L.; DANIEL, O.; ALMEIDA, A. E.; PINHEIRO A. L.; VERVLOT, F. B.; SOUZA, A. C. G. **A cultura da pupunha para produção de palmito: Sistema de produção e processamento industrial**, SIF documento SIF nº 020 Viçosa, 1999, 34p.

CVIKROVA ,M.; HRUBOCOVA, M.; JOSEF, E.; BINAROVA, P.. Change in the levels of endogenous phenolics, aromatic monoamines, phenylalanine ammonia-lyase, peroxydase and auxine oxidase activities during initiation of alfalfa embryogenic and non embryogenic calli. **Plant Physiology Biochem.** v. 34, p. 853-861,. 1996.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen source in Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis.; **Plant cell Tissue and Organ Culture**, p. 19-25, 2001.

DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (Ed.), In vitro embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academic**, p. 276–308, 1995.

EL BELLA, J .M.; EL HADRAMI, I (1998). Rôle possible des phénols liés aux parois et des féruloyl et P-coumaroyl oxydases dans l'embryogenèse somatique du palmier dattier. 2nd International Electronic Conference on synthetic organic chemistry (EC SOC-2), Sept. 1-30.

ERNST, D.; OESTERHELT, D. Changes of cytokinin nucleotides in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.) during growth and embryogenesis. **Plant Cell Report**, v. 4, p. 140–143, 1985.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E. & CARRON, M. P. Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3- acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Plant Science**, v. 88, p. 91-96, 1993.

FEHÉR, A.; TARAS, P. P.; DUDITS, D.; Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.

FERREIRA, S. A. N.; SANTOS, L. A. Viabilidade das sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus v. 22, p. 303-307, 1992.

FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**, v. 9, p. 659–669, 1996.

FITSGERALD, D. Non –two- dimensional gel electrophoresis approach for the proteomic analysis of membrane proteins. WANN, S. R.; JOHNSHON, M. A.; NOLAND, T. L.; CARLSON, J. A. Biochemical difference between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Report**, v. 6, p. 39-42, 1987. p.16-17, 2001.

FLORES, H. E. & FILNER, P. Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. **Plant Growth Regulation**, v. 3, p. 277-291, 1985.

FLORES, H. E. & FILNER, P. Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. **Plant Growth Regulation**, v. 3, p. 277-291, 1985.

GALSTON, A. W. & KAUR-SAWHNEY, R. 1990. Polyamines. **Plant Physiology**, v. 94, p. 406-410, 1990.

GAMBORG, O. L., The effects of amino acids and ammonium on the growth of *plant* cells in suspension culture **Plant Physiology**, v. 45, p. 372–375, 1970.

GUERRA, M. P., HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Report**, v. 7, p. 550-2, 1988.

GUERRA, M. P. HANDRO, W. Somatic Embryogenesis in Tissue Cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: AHUJA, R. (ed.). **Woody Plant Biotechnology**. New York, Plenum Pressp, p. 189-196, 1991.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa, v. 2, p. 533-568, 1999.

GUERREIRO, L. F. **Estudos de Mercado: palmito de pupunha**. Salvador Agência de fomento do estado da Bahia (Desenbahia), 2002. 14p.

GUIDERDONI, E.; MÉROT, B.; EKSOMTRAMAGE, T.; PAULET, F.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. C. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* species). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.), Somatic embryogenesis and synthetic seed I. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 31, p. 92–113, 1995.

GUZZO, F.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1427–1432, 1994.

HAHNE, G.; MAYER, J.E.; LORZ, H. Embryogenic and callus-specific protins in somatic embryogenesis of the grass *Dactylis glomerata* L. **Plant Science**, v.55 n. 3, p. 267-279, 1988.

HARTLEY, C. W. **The Oil Palm**. Trop. Agric. Series, Longman, London 1977.

HAYNES, P.A.; GYGI, S.P.; FIGEYS, D.; AEBERSOLD, R. Proteome analysis: Biological assay or data archive?, **Electrophoresis** v.19, p. 1862–1871,1998.

HEBY, O. & PERSSON, L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. **Trends Biochemical Science**, v. 15, p. 153-158, 1990.

HIRAGA, S.; ITO, H.; YAMAKAWA, H.; OHTSUBO, N.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MATSU, I. H.; HONMA, M.; OHASHI, Y.; An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 13 p. 210–216, 2000.

HUETEE, V. F.; ARIAS, M. O. Propagación vegetativa del pejobaye. **ASBANA**, v. 5(14), p.10-13, 1981.

ISHIKURA, N.; TERAMOTO, S. Procyanidins and catechins from callus and cells suspensions cultures of *Cryptomeria japonica*. **Agric. Biol. Chem.** v. 47 p. 421-423, 1983.

IVANOVA, A.; VELCHEVA, M.; DENCHEV, P.; ATANASSOV, A.; Van ONCKELEN, H.A. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. **Physiology of Plant**, v. 92 p. 85–89, 1994.

JAMES, D. J.; PASSEY, A. J.; DEEMING, D. C. Adventitious embryogenesis and the *in vitro* culture of apple seeds parts. **Journal of Plant Physiology**, v. 11, p. 217-219, 1984.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Relationship between endogenous hormone levels in grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. **Vitis**, v. 39, p. 151–157, 2000.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 389–395, 2001a.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in initial explants in embryogenic and nonembryogenic callus cultures of competent and non-competent wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 37–46, 2001b.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and nonembryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. **Plant Science**, v. 160, p. 247–257, 2001c.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulators** v. 47, p. 91–110, 2005.

JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 567–572, 2005.

KAKKAR, R. K., NAGAR, P. K., AHUJA, P. S. & RAI, V. K. Polyamines and plant morphogenesis. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 1-11, 2000.

KAMADA, H.; HARADA, H. Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. **Plant Cell Physiology**, v. 25, p. 27– 38, 1984.

KARTING, T.; KOGL, G.; HEYDEL, B.. Production of flavonoids in cells culture of *Crataegus monogyna*. **Planta medica** v. 59, p. 37-541, 1993.

KIYOSUE, T.; NAKAJIMA, M.; YAMAGUCHI, I.; SATOH, S.; KAMADA, H.; HARADA, H. Endogenous levels of abscisic acid in embryogenic cells, non-embryogenic cells and somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). **Biochemie and Physiologie der Pflanzen**, v.188, p. 343–347, 1992.

KOUAKOU, T.H.; KOUADIO, Y.J.; KONÉ, M.; ZOUZOU, M.; ANNO, A.P, Evolution des composés phénoliques au cours de la callogenèse et de la culture de suspensions cellulaires chez *Gossypium hirsutum* L. Bioterre, **Rev. Int. Sci. Vie Terre** . v. 4 (1), p. 143-151., 2004.

KOBAYASHI, M. **Plant Journal of Cellular and Molecular Biology**. V. 18, p. 185–193, 1999.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M. ; SUMABORE, S.; TOYA, T.; FUJIWARA A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Celular and Development Biology – Plant**, v. 28 , n. 1, p. 11-14, 1991.

KOUAKOU, T.H.; WAFFO, T. P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; TRISTAN, R.; DÉCENDIT, A.; MÉRILLON, J. M.. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29, 2007

KULCHETSCKI, L.; CHAIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. **Palmito pupunha (Bactris gasipaes Kunth): A espécie, cultura, manejo agrônômico, usos e processamentos**. Ponta Grossa: Editora UEPG, p. 13-22, p. 105-118, 2001.

KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V. G.; DAS, S. K.; GUPTA,V. S.; BHATNAGAR, R. K.; LEELEAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 635-639, 2003.

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS C. J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embriogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, n. 5, p. 461-473, 2005.

LOZOVAYA, V.; GORSHKOVA, T.; YABLOKOVA, E.; ZABOTINA, O.; AGEEVA, M.; RUMYANTSEVA, M.; KOLESNICHENKO, E.; WARANYUWAT, A.; WIDHOLM ,J.;

Callus cell wall phenolics and plant regeneration ability. **J. Plant Physiology**. v. 148, p. 711-717, 1996.

MALABADI, R.B., NATARAJA, K. Somatic embryogenesis and biochemical analysis of *in vitro*-derived plants of mothbean (*Vigna aconitifolia* Jacq.). **Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.** v. 4(2), p. 69-74, 2003...

MARTINEZ, L.E.; AGUERO, C.B.; LOPEZ, M.E.; GALMARINI, C.R.; Duval, Y. ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic embryo- Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium* species) in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) *cepa* L.) using polyamines. **Plant Science**. v.156, p. 221–226, 2000.

MONTAGUE, M. J.; ARNISTRONG T. A.; JAWORSKI, E. G. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Dnrczrs crrofn* L. 11. Changes in arginine decarboxylase activity. **Plant Physiology**, v. 63, p. 341-345, 1979.

MORA-URPI, J.; VARGAS, E.; LOPEZ, C. A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. **The Pejibaye Palm** (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Food and agriculture Organization of the United Nations, San Jose, Costa Rica, 1984.

MORA-URPI, J.; WEBER, J. C.; CLEMENT, C. R. **Peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 20. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatterleben and International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 83p.

NOGUEIRA, O. L.; CALZAVARA, B. B. G.; MULLER, C. H.; CARVALHO, C. J. R. de; GALVÃO, E. U. P.; SILVA, H. M.; RODRIGUES, J. E. L. F. CARVALHO, J. E. V. de; OLIVEIRA, M. do S.P. de; ROCHA NETO, O. G. de; NASCIMENTO, W.M.O. do. **A cultura da pupunha**. Brasília: EMBRAPA, 1995. p. 16-24 (Coleção plantar 25).

PEDROSO, M.C.; PRIMIKIRIOS, N.; ROUBELAKIS ANGELAKIS, A.; PASI, M.S., Free and conjugated polyamines in embryogenic and non embryogenic leaf regions of *Camellia* leaves before and during direct somatic embryogenesis. **Physiol. Plant**. v. 101, p. 213-219, 1997.

PINEDO, P.M.H. Organogenesis direct em ápices caulinares de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) . **Magister Teses, Turriabla: Costa Rica**, 1987, 110p.

PINTOS B.; MARTIN J. P.; CENTENO M. L.; VILLALOBOS N.; GUERRA H.; MARTIN L. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and nonembryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 955- 960, 2002.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, F.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p.285–301, 2006.

RAJASEKARAN, K.; HEIN M. B.; VASIL, I. K. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. **Plant Physiology**, v. 84, p. 47–51, 1987a.

RAJASEKARAN, K.; SAKHANOKHO H. F.; ZIPF, A.; SUKUMAR, S.; SHARMA, G. C.; CHEE, P. W. Somatic embryo initiation and germination in diploid cotton (*Gossypium arboreum* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology: Plant**, v. 40, n. 2, p. 177-181, 1987.

RAO, K.V.; SYRASANNA, P.; REDDY, G. M.. Biochemical changes in embryogenic an non-embryogenic calli of *Zea mays* L. **Plant Science**, v. 66, p. 127-130, 1990.

RESENDE, J. M.; FIORI, J. E.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; BOTREL, N. Processamento do Palmito de Pupunheira em Agroindústria Artesanal - Uma atividade rentável e ecológica. Sistemas de Produção, 01/Embrapa Agrobiologia. Versão Eletrônica, jan. 2004. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicações/sistemasdeprodução/pupunha/index.htm>. Acesso em: 08 nov.2008.

RONCHI, V. N., CALIGO, M. A., NOZZOLINI, M.; UCCARINI, G. Stimulated of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. **Plant Cell Report**, v. 3, p. 210-214, 1984.

SANTANEN, A.; SIMOLA, L. K. Metabolism of L[U-¹⁴C]-arginine and L[U-¹⁴C]-ornithine in maturing and vernalised embryos and megagametophytes of *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, v.107, p. 433-440, 1999.

SASAKI, K.; SHIMOMURA, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 1159–1164, 1994.

SCHIAVONE, F. M.; COOKE, T.J. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, p. 53–62, 1987.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.

SHARP, W. R.; EVANS, D.A.; SONDAHL, M.R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant Tissue Culture**. p. 759-762, 1982.

SHOEB, F.; YADAV, J. S.; BAJAI S.; RAJAM, M. V.; Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of Indica rice. **Plant Science**, v. 160, p. 1229-1235, 2001.

STEIN, K. M. Tissue culture of the pejibaye palm (*Bactris gasipeas* H.B.K.). Master Science Theses, Iowa: Iowa State University, 197p, 1988.

STEIN, K. M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on Somatic Embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Turrialba**, v. 4, p. 196-201, 1991.

STEINMACHER, D.A. **Germinação in vitro, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**, 2005, 125p, Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE G. C. CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p.15–22, 2007b.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany** p.1–11, 2007c.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45 n. 10, p.705-708, 1958

SWARNKAR, P.; BOHRA, S.; CHANDRA, N. Biochemical changes during growth and differentiation of the callus of *Solanum surattense*. **Journal of Plant Physiology**, v. 126, p. 75-8, 1986.

TABOR C. W.; TABOR, H. (1984) Polyamines. **Rev Biochem**, v. 53, p. 749-790, 1984.

TAKEDA, T.; HAYAKAWA, F.; KANAKO, O.; MATSUOKA, H. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p. 21-28, 2002.

TUPY, J.; HRABETOVA, E. A.; CAPKOVA, V., **Plant Science Letters**, 1983, v. 30, p. 91–98, 1983.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloran-induced somatic embryogenesis in peibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 149-156, 1987a.

VILLACHICA, L. **Cultivo del peyipayo (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito en la Amazonia**. Tratado de Cooperación Amazonica, p. 146, 1996.

YAMASAKI, H.; COHEN, M.F.. No signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? **Trends in Plant Science**. v. 11, p. 522- 524, 2006.

WETHERELL, D. F. AND DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth than embryogenesis in cultured wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 97–103, 1976.

WANN, S. R.; JOHNSON, M. A.; NOLAND, T. L.; CARLSON, J. A. Biochemical difference between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Report**, v. 6, p. 39-42, 1987.

ZHU, M.; XU, A.; YUAN, M.; HUANG, C. H.; YU, Z.; WANG, L.; YU, J. Effects of amino acids on callus differentiation in barley anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 22, p. 201–204, 1990.

CAPITULO II

ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISOLÓGICAS DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E NÃO EMBRIOGÊNICOS DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes*).

1- Resumo

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth – Arecaceae) é uma palmeira nativa do trópico úmido americano. Nos últimos anos, o seu cultivo para a produção de palmito vem despertando o interesse de agricultores de todo o país. A embriogênese somática é uma ferramenta biotecnológica a ser aplicada para a micropropagação clonal massal, considerando as limitações dos sistemas convencionais de propagação desta espécie. No presente trabalho eventos e processos bioquímicos e fisiológicos em calos embriogênicos e não embriogênicos foram estudados para uma melhor compreensão da embriogênese somática nesta espécie. Mudanças nas concentrações endógenas de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), poliaminas (PAs), aminoácidos e fenóis totais foram analisadas. Concentrações de aminoácidos, PAs, AIA e ABA foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência e fenóis totais a partir da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro. Diferenças entre calos embriogênicos e não embriogênicos para AIA, ABA, PAs, aminoácidos e fenóis totais foram encontradas. Para AIA e ABA calos embriogênicos apresentaram níveis mais altos, estando estes associados à indução e aumento da competência embriogênica. Já para PAs e fenóis totais, calos não embriogênicos apresentaram níveis mais elevados, especialmente para poliamina putrecina. Estes eventos podem estar associados a um rápido crescimento do calo e não com a competência embriogênica. Alguns aminoácidos tiveram suas expressões envolvidas com a competência ou não dos calos. Os altos níveis de triptofano observados em calos embriogênicos podem estar associados a uma maior síntese de AIA nos mesmos. Já a arginina pode ter sido a precursora da putrecina, a qual foi expressa em maior quantidade em calos não embriogênicos. Diferenças nas concentrações de AIA, ABA e PAs entre calos embriogênicos e não embriogênico associado a níveis endógenos de aminoácidos sugerem que estes compostos podem se constituir em marcadores da capacidade embriogênicos de pupunha.

Palavras Chaves- Calos embriogênicos, Calos não embriogênicos, AIA, ABA, Poliaminas, Aminoácidos e Fenóis totais.

2- Abstract

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth - Arecaceae) is a native palm to the American humid tropics. In recent years, its cultivation for the production of palm is attracting the interest of farmers throughout the country. Considering the limitations of conventional systems for the propagation of this species, somatic embryogenesis is a biotechnological tool to be applied for its mass clonal micropropagation. In this work physiological and biochemical processes and events in embryogenic and non embryogenic callus were studied. Changes in endogenous levels of indole acid (IAA), abscisic acid (ABA), polyamines (PAs), amino acids and total phenols were analyzed. Amino acids, PAs, IAA and ABA were determined by HPLC, and total phenols were analyzed by means of absorbance in spectrophotometer. Differences between embryogenic and non embryogenic callus for IAA, ABA, PAs, amino acids and total phenols were found. For IAA and ABA embryogenic callus showed higher levels, and were associated to embryogenic competence. For PAs and total phenols, non-embryogenic callus showed higher levels, especially for putrescine. These events may be associated with a rapid growth of callus and not with the embryogenic competence. Some amino acids had their expressions involved in the competence of the callus or not. High levels of tryptophan observed in embryogenic callus may be associated with an increased synthesis of IAA in those callus. Arginine was suggested to be the precursor of putrescine expressed in greater levels in non-embryogenic callus. Differences on IAA, ABA and PAs levels among embryogenic and non embryogenic callus associated with endogenous levels of amino acids suggest that these compounds can be considered reliable markers of embryogenic competence.

Keywords-embryogenic callus, non-embryogenic callus, IAA, ABA, polyamines, amino acids and total phenols.

3- Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de palmito, com 90% da produção proveniente do extrativismo de populações naturais de juçara (*Euterpe edulis*) e açaí (*Euterpe oleraceae*) (Chaimsohn, 2001). Diante desta alta demanda, a exploração predatória provocou uma grande redução nas populações naturais destas palmeiras. Para diminuir essa pressão surgiu a necessidade de plantios organizados para a exploração permanente do palmito. Considerando as características favoráveis da palmeira pupunha seu plantio se expandiu desde 1990, despertando, assim, o interesse de agricultores de todo país. Sua propagação é realizada por sementes, mas, como mencionado anteriormente, este procedimento tem limitações e, portanto, novas estratégias de propagação devem ser buscadas.

Técnicas baseadas na cultura de tecidos vegetais podem ser aplicadas com sucesso para a micropropagação massal da pupunha. Dentre as técnicas empregadas, a embriogênese somática apresenta-se como opção viável, assim como demonstram os trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC por Steinmacher et al. (2007a, 2007b, 2007c).

No entanto, nestes trabalhos, baixas taxas de calos embriogênicos foram obtidas, independente do explante utilizado. Para embriões zigóticos apenas 9.8% dos explantes iniciais formaram calos embriogênicos, enquanto que a formação de calos sem competência embriogênica foi de 78%. Utilizando inflorescência como fonte de explante também foram observadas taxas similares às observados para embrião zigótico com 10% de formação de calos embriogênicos. Já para meristemas como fonte de explante foi observada uma taxa de 72% de calos primários, mas somente 43% desses calos formaram calos com competência embriogênica.

Assim, apesar dos expressivos avanços obtidos nestes trabalhos a embriogênese somática nesta espécie ainda apresenta limitações que precisam ser superadas para que esta técnica seja de uso rotineiro em laboratórios de micropropagação. É preciso salientar, contudo, que palmeiras são consideradas recalcitrantes às técnicas de cultura de tecidos vegetais.

A indução e desenvolvimento de embriões somáticos vegetais são afetados por diversos fatores, sendo os principais o genótipo, a idade e origem do explante e os

teores de hormônios (Terzi e Loschiavo, 1990). O nível de hormônios é considerado como um dos fatores cruciais que determinam o potencial embriogênico dos explantes (FEHÉR et al., 2003; Gaj, 2004).

Auxinas são consideradas os hormônios mais importantes na regulação da embriogênese somática (Cooke et al., 1993). Esta regulação pode ocorrer por meio do estabelecimento de um gradiente de auxina durante a fase inicial, o que é essencial para estabelecer a simetria bilateral dos embriões (Schiavone e Cooke, 1987; Liu et al., 1993; Fischer e Neuhaus, 1996).

As poliaminas (PAs), espermidina (Spd), espermina (Spm) e putrecina (Put) são pequenas aminas alifáticas e estão presentes em todas as células vegetais (Bouchereau et al., 1999). Evidências recentes apóiam seu papel na regulação da proliferação celular e diferenciação em sistemas vegetais (Bouchereau et al., 1999; Bais e Ravishankar, 2002).

Em sistemas experimentais *in vitro* as PAs podem influenciar em muitas funções celulares, incluindo transcrição e tradução (Kumar et al. 1997). Shoeb et al. (2001), propuseram que não apenas o conteúdo de PAs mas também a relação Put/Spd, constituem importantes biomarcadores da morfogênese *in vitro*. O aumento nos níveis de PAs nos tecidos cultivados *in vitro* pode reduzir os teores de etileno e a promoção da morfogênese (Andersen et al., 1998).

Estudos têm mostrado que as poliaminas interagem de alguma forma com outros hormônios vegetais, sugerindo-se também que auxinas e giberelinas podem induzir a síntese de poliaminas (Bagni e Serafini-Fracassini, 1985; Smith et al., 1985). Em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, o conteúdo endógeno de poliaminas foi maior em culturas embriogênicas cultivadas em meios suplementado com outros fitorreguladores do que quando cultivado na ausência desses (Steiner et al., 2007)

Os fenóis constituem um importante grupo de metabólicos secundários, que além de ter funções ecológicas, podem atuar como moduladores de desenvolvimento vegetal, regulando o catabolismo do AIA (Volpert et al., 1995). Outra função dos fenóis é a sua capacidade em aumentar a rigidez da parede celular vegetal, como ponte molecular entre os compostos da parede celular (Fry, 1996). A consequência da formação de pontes fenólicas é uma perda da extensibilidade das células da parede, conduzindo assim a cessação das células de crescimento. Em culturas de células

vegetais, esses compostos podem desempenhar um papel muito importante na indução de culturas embriogênicas em varias espécies.

Os aspectos anteriormente mencionados revelam a necessidade de serem estudados e estabelecidos marcadores fisiológicos e bioquímicos para a identificação precoce da competência embriogenética nos modelos biológicos de interesse (Swarnkar et al.,1986; Wann et al.,1987; Rao et al.,1990; Kouakou et al., 2007). Isto permitiria a melhoria das condições de cultivo visando a modulação de um protocolo otimizado para a embriogênese somática nesta espécie.

Assim, considerando a importância de estudar os mecanismos que envolvem a embriogênese somática e que afetam a indução de calos embriogênicos e não embriogênicos em pupunha, o presente trabalho teve como objetivo quantificar hormônios endógenos, poliaminas, aminoácidos e fenóis totais com intuito de identificar marcadores bioquímicos associados à competência embriogenética *in vitro* nesta espécie.

3.2-Objetivos específicos

- Estabelecer relação entre os níveis de ABA, AIA, Poliaminas, aminoácidos e fenóis totais e o potencial embriogênico comparando calos embriogênicos e não embriogênicos.

4- Material e Métodos

4.1 - Material Vegetal

O material vegetal utilizado no presente estudo foram sementes oriundas de plantas de polinização aberta da população Yurimanguás. As sementes foram fornecidas pelo Sr. Calos Antônio Moura de Toledo, proprietário de um plantio comercial de pupunha, em Rondônia, e enviadas por correio.

Para o processo de desinfestação, primeiramente foi retirado o endocarpo e posteriormente as sementes propriamente ditas foram mergulhadas em água corrente por 10 min. Já em câmara de fluxo laminar elas foram imersas em álcool 70°GL por 10 min, seguido de hipoclorito de sódio (2%) por 40 minutos. Em seguida foi realizada a

tríplice lavagem com água destilada e autoclavada para remoção do excesso de hipoclorito.

4.2-Meio de cultura para indução de calos e condição de cultivo

Embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura basal de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose e vitaminas de Morel (Morel e Wetmore 1951) e com 500mg.l⁻¹ de glutamina, 2,5gl⁻¹ de Phytigel® e 10µM de Picloram, seguindo o protocolo proposto por Steinmacher (2007a). O meio de cultura foi autoclavado a 120°C (1Kg. cm²) durante 15 min, e vertido em placas de petri descartáveis (20X80), contendo aproximadamente 25 ml de meio de cultura em cada placa. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da adição do Phytigel® e todas as culturas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C.

Dois tipos de calos foram formados, calos sem capacidade embriogênica com coloração amarelo para o amarelo escuro e crescimento desorganizado e calos embriogênicos com estruturas organizadas e coloração branca ou amarelada.

Após a formação de calos embriogênicos as culturas foram repicadas para placas de Petri contendo meio de maturação composto pelo meio de cultura basal descrito acima, suplementado com 2,4-D (10 µM), 2-iP (10 µ M), carvão ativo (1,5 gl⁻¹), Glutamina (1 gl⁻¹) e caseína hidrolisada (0,5 gl⁻¹). Subcultivos para meios novos foram realizados a cada quatro semanas.

4.3 – Extração e quantificação de AIA e ABA

A metodologia utilizada foi a descrita por Kojima (1996), com modificações. A matéria fresca (1g) de calos embriogênicos e não embriogênicos foram maceradas com nitrogênio líquido, sobre o gelo, adicionando-se 3 ml de tampão de extração (Etanol 80% + 1% PVP-40). O extrato foi transferido para tubos falcon (15 ml), juntamente com 2 ml de tampão de extração utilizado para lavar o resíduo do graal. Ao extrato foi adicionado 100 µl de solução [³H] AIA e 100 µl de solução [³H] ABA. O extrato foi agitado por 1:30 h em agitador, resfriado no escuro. Após agitação foi centrifugado a 4°C, por 15 min., a 11000 rpm (15500x g). O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon (15ml) e armazenado a -20°C. A amostra foi então

concentrada em “speed vac”, a 45°C, até atingir 20% do volume inicial ($\leq 1,0$ mL) . Os volumes das amostras foram equilibrados em balança para 3 ml com água Milli’Q. Ácido clorídrico (HCl 1N) foi adicionado as amostras até o pH atingir 2,5. As amostras foram então colocadas em funil de separação para particionamento (em capela). No tubo falcon a amostra particionada, foi adicionado 6 ml de éter etílico para lavagem do mesmo, e transferida para o funil para se juntar com a amostra. O funil foi agitado e deixado descansar por poucos segundos. Em seguida a fase aquosa (inferior) foi coletada em um Becker e a fase orgânica devolvida ao seu respectivo tubo falcon. A fase aquosa foi devolvida ao funil acrescentando-se 6 ml de éter etílico. A nova fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi juntada a primeira no tubo falcon. O tubo falcon contendo as fases orgânicas foi banhado em N líquido por 10 s e transferido seu conteúdo para outro tubo falcon (15 ml), o qual foi colocado em “speed vac”, a 45°C, até secar totalmente (30 min). O pellet foi ressuspenso em 300µl de Metanol (MeOH), sendo agitado por 2 min. A amostra foi transferida, com o auxílio de micropipeta P1000 para um tubo de 1,5 ml devidamente identificado, armazenado a -20°C, até o momento da análise em HPLC.

As quantificações de ABA e AIA foram realizadas em HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se a solução 10% MeOH/0,5% HAc (ácido acético glacial) (eluente A) e metanol 100% (eluente B). O detector de UV foi ajustado em 254nm, para detecção de ABA. Para detecção de AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 280nm, e emissão em 350nm. A coluna foi equilibrada com 20% do eluente B, e a temperatura do forno para 40°C. O fluxo dos eluentes foi de 1ml/min e o gradiente de metanol foi ajustado para atingir 100% em 60 min. Foram injetados 40 µl de amostra. O tempo de retenção do ABA foi de aproximadamente 21.57 min e do AIA 29.29 min. As frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (PACKARD modelo Tri-carb 2100 TR), para estimativa de perdas. As áreas e os tempos de retenção do AIA e do ABA foram comparadas com concentrações padrões destes hormônios.

4.4 – Extração e quantificação de poliaminas

A metodologia usada foi a descrita por Silveira et al. (2004), com modificações. Aproximadamente 150 mg de matéria fresca de calos embriogênicos e não embriogênicos foram maceradas com nitrogênio líquido até formar um pó, ao qual foi remacerado com 1,4ml de ácido perclórico 5% (PCA5%), sendo que 0,7ml deste foram usados para maceração em si, e o restante foi usado para lavar o resíduo do graal. O extrato foi colocado em tudo de 2 ml e repousou por 1h. O extrato foi então centrifugado a 20000g durante 2 min a 4°C. o sobrenadante foi armazenado, e o pellet ressuscitado em 0,2 ml de PCA 5%, e novamente centrifugado (20000g/4°C/20min.). O sobrenadante foi coletado juntando com o primeiro homogeneizado. O precipitado foi descartado. Para extrair as poliaminas conjugadas solúveis, 200 µl do sobrenadante foi coletado e acrescentado 200µl de HCl concentrado (12 N), os tubos foram vedados e aquecidos a 110°C por 18 h. Para poliaminas livres, o restante do sobrenadante foi congelado para futura dansilação. Após 18 h de aquecimento (poliaminas conjugadas) as amostras foram secas com jato de N₂ a 40° C e o pellet ressuscitado em 180 µl de PCA. As amostras foram congeladas para posteriores dansilação.

A dansilação das poliaminas livres e conjugadas se deu coletando 40 µl de cada amostra de poliaminas (livres/ conjugadas) e colocando em um tubo de 500µl, onde foram adicionados 20 µl de Diaminoheptano (DAH) 0,05 mM, 50 µl de solução saturada de carbonato de sódio e 100 µl de solução de cloreto de Dansyl (5mg/ml de acetona-1,8mM), os tubos foram lacrados e homogeneizados. As amostras foram incubadas no escuro por 50 min a temperatura de 70°C. Após a incubação, adicionou-se 25 µl de solução de prolina (100mg/ml de água Milli'Q), que foram homogeneizados e posteriormente incubados no escuro por 30 min. a temperatura ambiente. Adicionou-se 220 µl de tolueno e as foram amostras agitadas. Coletou-se 175µl da fase orgânica (superior), seca em "speed vac" aquecida a 40°C. O pellet foi ressuscitado em 175 µl de acetonitrila e armazenada em freezer até o momento da quantificação.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se acetonitrila pura (orgânica) e acetonitrila 10% (inorgânica), com pH ajustado com HCl 1N. A coluna foi calibrada com 65% de acetonitrila, com um fluxo de 1ml/min, atingindo 100% aos 25 min, permanecendo por 35 min. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µl de

amostras. As áreas e os tempos de retenção de cada PA foram avaliadas por comparação com padrões de concentrações de PAs conhecidas, como, Put, Spd, Spm, DAH.

4.5 – Extração e quantificação de aminoácidos

A metodologia usada foi a descrita por Astarita et al. (2003). Para extração dos aminoácidos, 200 mg de calos embriogênicos e calos não embriogênicos foram macerados em 6 ml de etanol 80%. Com o auxílio de uma pipeta o material foi transferido para tubos falcons (15ml) e secos em “speed vac” a 45°C até serem reduzidas a 0,6 ml. Em seguida as amostras foram ressuspensas para 2 ml com água milli-Q e centrifugadas a 15000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 2 ml, filtrados em membranas 0,2 µm e armazenados em freezer -20°C, para subseqüentes análises.

Alíquotas de 20 µl do filtrado e 60 µl da solução de OPA-borato, utilizadas para a derivatização dos aminoácidos à temperatura ambiente foram homogeneizadas por 2 min e a seguir analisados por HPLC.

A identificação e quantificação dos aminoácidos por HPLC foram realizadas utilizando uma coluna de C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solvente metanol 65% e uma solução de acetato de sódio 50mM, fosfato de sódio 50 mM, metanol (20ml. L⁻¹) e tetrahidrofurano (20 ml. L⁻¹) com pH ajustado para 8,6 com ácido acético glacial. A mudança na proporção de metanol 65% em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 65% programado para 15% durante os primeiros 34 min, de 15 a 35% entre os 34 e 55 min, de 35 a 85% entre 55 e 75 min, de 75 a 100% entre 75 e 85 min e 100% até 100 min, com fluxo de 1ml.min⁻¹, a 40°C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 250nm e emissão de 480nm. Foram injetados 20µL da solução derivatizada com OPA. As áreas e o tempo de retenção de cada aminoácido foram comparados com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas.

4.6 – Extração e quantificação de fenóis totais

Para extração dos fenóis totais, 300 mg de material vegetal, calos embriogênicos e não embriogênicos, foram maceradas com nitrogênio líquido. Ao macerado, adicionou-se 7,5 ml de metanol acidificado com 0,1% de HCl (v/v), e colocado na geladeira por 1h, sendo então centrifugado a 1360g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi espalhado em placa de Petri e colocado em estufa a 42°C. O resíduo foi ressuspensionado em 5 ml de metanol 95%. Uma alíquota de 1 ml foi separada em tubos de vidro de 10 ml, onde foi adicionado 1 ml de etanol 95%, 5 ml de água ultrapura e 0,5 ml de Folin-Ciocalteu, deixou-se repousar por 5 min. Adicionou-se então 1 ml de carbonato de sódio (5% v/v) e após agitação breve, as amostras foram colocadas em repouso, no escuro, por 1hr. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1230) à 725 nm. Foi usado como controle negativo metanol 95%. Todas as análises foram realizadas em triplicata com base na curva padrão de ácido gálico ($y = 1,4028x - 0,0259$; $r = 0,999$). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 1g de massa fresca.

5 – Análise Estatística

Os níveis de hormônios endógenos de AIA, ABA. Poliaminas, aminoácidos e fenóis totais foram analisados pelo software STATSTICA para Windows versão 7.0, utilizando três repetição de amostra biológica para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados pelo teste T para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. ($P < 0.05$).

6 – Resultados e Discussão

6.1- Níveis endógenos de AIA e ABA

Os dois tipos de calos, embriogênicos e não embriogênicos, já descritos em um grande número de monocotiledôneas (Vasil e Vasil 1985; Wang et al., 1990) diferem com base em seus conteúdos hormonais.

No presente trabalho os teores de AIA endógeno presentes em calos embriogênicos (CE) (Figura 2.5 a) e calos não embriogênicos (CNE) (Figura 2.5 b) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. No entanto, calos embriogênicos

apresentaram quase o dobro de AIA endógeno ($0,07\mu\text{g/g}$ de MF) quando comparados com os calos não embriogênicos ($0,04\mu\text{g/g}$ de MF). (Figura 2.1) Resultados similares foram encontrados em diversas espécies de planta (Rajasekaran et al., 1987; Ivanova et al., 1994; Michalczuk e Druart, 1999). Em células de cenouras a presença de AIA endógeno em calos embriogênicos foi 50 vezes maior quando comparado com calos não embriogênicos (Jimenez e Bangerth, 2001).

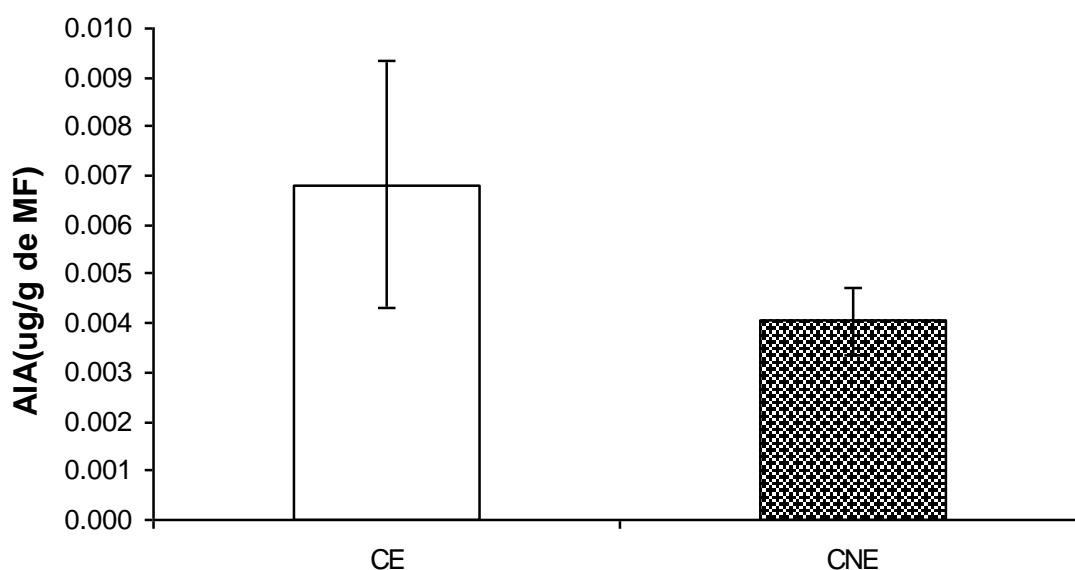


Figura 2.1 Concentração de hormônios endógenos em calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) A- Concentração média de AIA no calo embriogênico (CE) e no calo não embriogênico (CNE). (média \pm desvio padrão, $n=3$).

As auxinas são conhecidas como mediadores de transcrição das células somáticas (Jimenez, 2001), além de regularem diversos processos de desenvolvimento da planta (Reed, 2001). Altas concentrações de AIA endógeno tem sido associada com um aumento da resposta embriogênica (Ivanona et al., 1994), o que corrobora com os resultados do presente trabalho onde calos com competência embriogênica apresentaram níveis mais altos de AIA endógeno.

Outro hormônio importante que afeta o desenvolvimento embrionário é o ABA. Nas análises para verificar os teores endógenos desse hormônio foram também detectados teores maiores em calos embriogênicos ($0,808\mu\text{g/g}$ de MF) quando comparados com calos sem competência embriogênica ($0,353\mu\text{g/g}$ de MF). Assim, os calos embriogênicos apresentaram valores 2,5 vezes maiores de ABA endógeno do que aqueles observados em calos não embriogênicos (Figura 2.2).

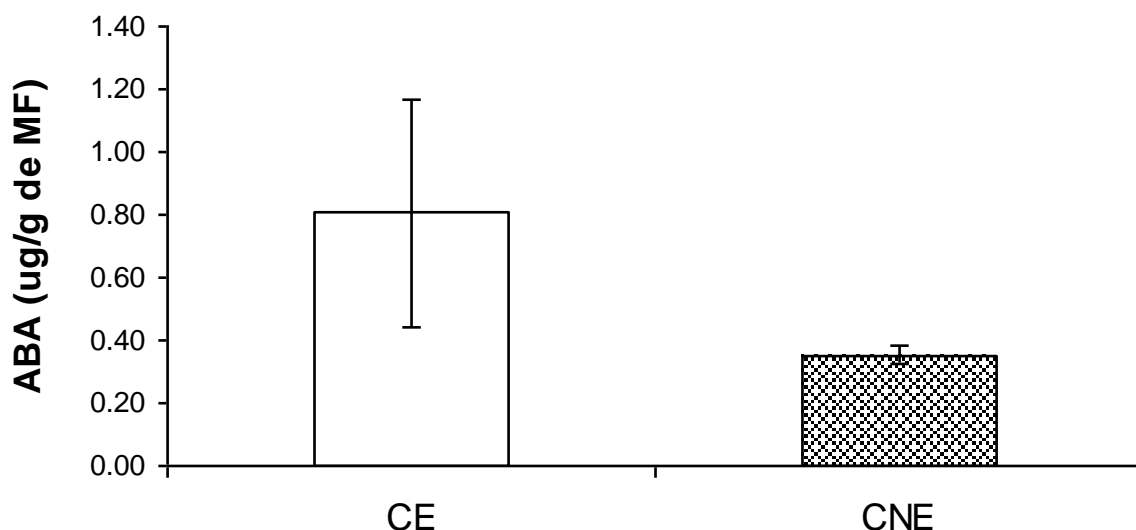


Figura 2.2- Concentração média de ABA nos calos embriogênicos e nos calos não embriogênicos de pupunha (média \pm desvio padrão, n=3).

Concentrações maiores de ABA em calos embriogênicos quando comparadas aquelas observadas em calos não embriogênicos também foram observadas em outras espécies, tais como *Daucus carota* (Jimenez e Bangerth, 2001), *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran et al. 1987), sendo que em *Daucus carota* a quantidade deste hormônio foi 10 vezes maior em CE do que em CNE. Estes resultados sugerem que altos teores desse hormônio são necessários para indução e manutenção da competência embriogênica (Kiyosue et al. ,1992)

De acordo com Bess (1992) uma grande variação de um componente no meio de cultura pode ser responsável por uma alteração na expressão gênica, resultando em uma desorganização celular associada a uma elevada razão auxina/citocinina endógena, que poderia explicar a aleatória e espontânea formação de CE e CNE.

Nas análises de ABA e AIA, percebe-se que os resultados foram inversos, e muito diferentes quanto à quantidade, onde as concentrações de ABA foram muito superiores aos valores encontrados de AIA

Existem controvérsias sobre o função do ABA e do AIA na indução da resposta embriogênica em cultura de tecidos. Com relação ao primeiro, a redução dos níveis endógenos de ABA em cultura de folhas de *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran et al., 1987) e no presente trabalho (CNE) inibiu a capacidade para produzir embriões somático ao mesmo tempo em que promoveu a aquisição e manutenção da capacidade embriogênica em calos de *Hevea brasiliensis* (Etienne et al., 1993).

No que diz respeito a auxina, Sasaki et al (1994) encontraram níveis 15 vezes maiores de AIA em células embriogênicas de cenoura do que em calos não embriogênicos, sendo esta relação invertida em culturas de calos da mesma espécie (Michalczuk et al., 1992). Por outro lado, Besse et al. (1992) não observaram diferenças no conteúdo de AIA endógeno em linhas de calos de *Elaeis guineensis* que diferiram em suas respostas embriogênicas. Portanto, parece que os efeitos endógenos de AIA e ABA na indução e desenvolvimento da embriogenese *in vitro* depende do material vegetal e das condições de cultura. (Centeno et al., 1997)

A razão de AIA/ABA encontrada no presente trabalho foi de 0,0866 para calos embriogênicos e 0,111 para calos não embriogênicos. (Tabela 2.1). Em avelã resultados contrários foram observados e cotilédones embriogênicos apresentaram a razão AIA/ABA quase duas vezes mais elevada que a observada em culturas não embriogênicas. A importância desta relação em explantes, mais do que o conteúdo de AIA e ou ABA, para indução e expressão da embriogenese somática foi identificada em folhas de *Medicago falcata* por Ivanova et al. (1994), que estabeleceu uma correlação positiva entre valores de auxinas favoráveis e capacidade embriogenica dos explantes.

Tabela 2.1 Razão AIA/ABA nos calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*)

Calos	AIA/ABA
CE	0,0866
CNE	0,111

6.2 – Poliaminas endógenas

Diversos estudos têm mostrado que a competência embriogênica para formação de calos embriogênicos, embriões somáticos e seu subsequente desenvolvimento são afetados pelos níveis de PAs presentes nas culturas (Faure et al., 1991; Galston e Flores, 1991; Cangahuala-Inocente, 2007)

No presente trabalho, PAs livres e conjugadas foram analisadas em calos embriogênicos e não embriogênicos revelando diferenças marcantes.

Foram encontrados os três tipos de PAs: Put, Esp, e Esm, tanto na forma conjugada quanto na forma livre (Figura 2.3 A e B). No entanto elas se apresentaram

mais abundantes na forma livre (Figura 2.3a). Como no caso de qualquer regulador de crescimento vegetal, o pool intracelular de PAs livres não depende somente de sua síntese, mas também de outros processos que incluem a degradação de PAs conjugadas (Tiburcio et al., 1997).

As PAs conjugadas estão geralmente ligadas com ácidos fenólicos (Tiburcio et al., 1997). É provável que a conjugação de PAs seja importante na desintoxicação de compostos fenólicos conhecidos por serem inibidores de crescimento (Bouchereau et al., 1998). No presente trabalho foi observada uma quantidade muito maior de compostos fenólicos em calos não embriogênicos e esse resultado dá suporte a esta hipótese, uma vez que calos não embriogênicos apresentaram níveis muito maiores de PAs conjugadas que nos calos embriogênicos

A Put foi a PA mais abundante tanto na forma livre quanto na forma conjugada seguida de valores inferiores de Spd e Spm, respectivamente. Ao comparar os dois tipos de calos observou-se maiores teores de Put em calos não embriogênicos do que em calos embriogênicos, o que não ocorreu para Spm e Spd, já que as concentrações dessas PAs não foram diferentes significativamente entre os dois calos (Figura 2.3 C). Resultados semelhantes foram encontrados por Monteiro et al. (2002) onde culturas não embriogênicas de *Panax ginseng* apresentaram um maior acúmulo de Put do que calos embriogênicos.

As gramíneas *Lasiurus scindicus*, *Sorghum halepense* e *Urochloa panicoides* (Kackar e Shekhawat, 2007) a Spd não foi detectada em calos não embriogênicos, sendo somente detectada nos calos com competência embriogênica. Isso não foi observado no presente trabalho, já que Spd e Spm foram detectadas nos dois tipos de calos (Figura 2.3 C)

O papel da Put no crescimento celular ainda não está totalmente elucidado. De acordo com Havelange et al. (1996) essa PA pode estar relacionada ao estímulo da divisão celular. Isto foi reforçado com os resultados obtidos com culturas de *Catharantus roseus* onde com o bloqueio da síntese de Put inibiu a divisão celular (Minocha et al., 1991). Apesar da Put ser importante para manutenção da proliferação celular, a presença de Spd e Spm é necessária para que ocorra a diferenciação celular (Galston e Kaur - Sawhney, 1990).

No presente trabalho, quando comparada as PAs totais, observou-se uma grande diferença entre os calos, com níveis mais elevados desses compostos em calos não embriogênicos (Figura 2.3C). Essa relação também foi encontrada por Litz e

Schaeffer (1987) em *Mangifera indica* L sugerindo que a síntese de PAs pode estar associada a um rápido crescimento do calo e não com a capacidade embriogênica.

Em relação às gramíneas já citadas anteriormente, Kackar e Shekhawat (2007) observaram uma quantidade muito maior de PAs em calos não embriogênicos do que em calos embriogênicos, com um diferencial para Put que apresentou teores 2,5 vezes maiores em calos não embriogênicos que em calos embriogênicos. Isto está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho onde calos não embriogênicos apresentaram 6,75 vezes mais Put do que os calos embriogênicos (Figura 2.3C)

A razão [Put/(Spd+Spm)] apresentou valores elevados em ambos os calos, a maior razão foi detectada em calos não embriogênicos (11,114) (Figura 2.3 D). Esses valores elevados são consequência dos altos valores de Put. O acúmulo desta PA está associado com respostas a estresses, identificadas pelo aumento na síntese de Put, ou ausência da sua degradação. Culturas de folhas e protoplastos sensíveis a estresse osmótico revelaram elevados teores de Put e uma aparente diminuição na capacidade de sintetizar Spd a partir de Put (Bouchereau et al., 1999). Associado a essas informações acredita-se que os calos não embriogênicos apresentam níveis de estresses maiores o que calos embriogênicos.

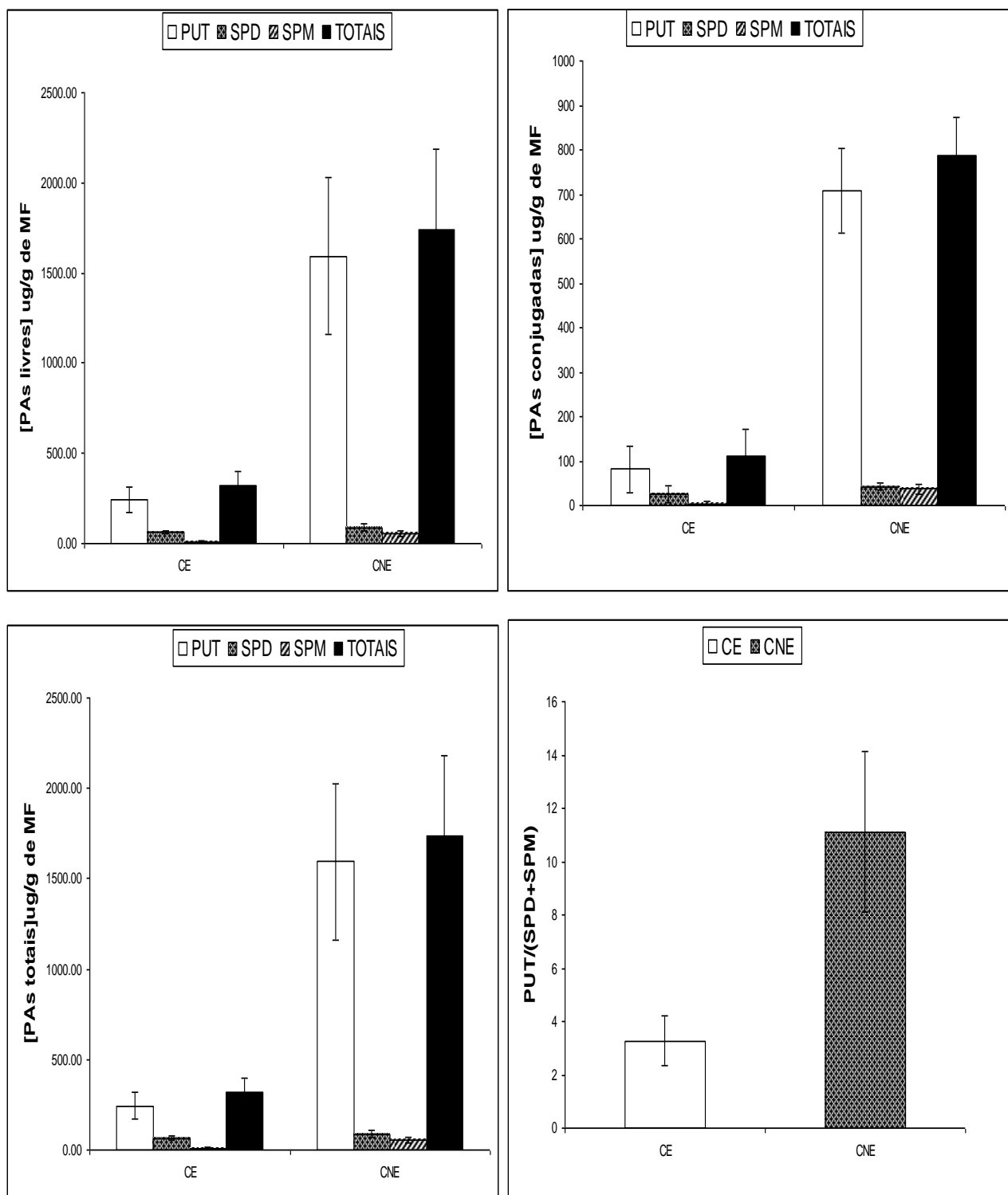


FIGURA 2.3 - Poliaminas endógenas em calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*) **A** - Poliaminas endógenas livres. **B** - Poliaminas endógenas conjugadas, **C** - Poliaminas endógenas totais. **D** - Razão de Put/(Spd+Spm) em calos embriogênicos e não embriogênicos. (média \pm desvio padrão, n=3).

6.3 Aminoácidos endógenos

Os teores de aminoácidos livres são de importância relevante na regulação do crescimento da planta e nos processos morfogênicos como embriogênese e organogênese (Wetherell e Dougall, 1976). No presente estudo foi constatada uma diferença de aminoácidos endógenos entre calos embriogênicos e não embriogênicos (Tabela 2.2). Os calos embriogênicos apresentaram valores inferiores de aminoácidos livres. Esse resultado associado aos resultados encontrados nas análises de proteínas na comparação desses dois calos (capítulo III) permite inferir que calos embriogênicos apresentam quantidade inferior de aminoácidos livres, pois esses podem ter sido precursores para síntese de proteínas. De acordo com Merkle et al. (1995) e Prewein et al (2006) diversas proteínas, entre elas as proteínas de reservas, são sintetizadas a partir de aminoácidos livres e podem ser utilizadas desde os primeiros estádios do desenvolvimento embrionário até a fase autotrófica.

Todos os aminoácidos essenciais foram encontrados, exceto a ornitina em ambos os calos e a cisteína que não foi observada em calos não embriogênicos. Calos sem competência embriogênica apresentaram alguns aminoácidos como ácido glutâmico, histidina, treonina, alanina, gaba e lisina com níveis muito superiores quando comparados com calos embriogênicos, no entanto não houve diferenças estatísticas entre esses aminoácidos (Tabela 2.2).

Leucina, histidina e lisina inibiram fortemente a embriogênese somática em cenoura (Wetherell e Dougall, 1976; Kamada Harada, 1979) já que esses aminoácidos não são capazes de ser metabolizados e nem transformados em outros aminoácidos, (Dougall 1966; Mifflin e Lea 1976). Os resultados do presente trabalho dão suporte aos resultados encontrados por estes autores uma vez que calos sem competência embriogênica apresentaram uma maior quantidade de alguns desses aminoácidos, tais como histidina e lisina.

Os aminoácidos arginina e a ornitina são precursores das PAs (Put, Spm e Spd,), cuja síntese é iniciada através da arginina descarboxilase (ADC) para arginina e ornitina descarboxilase (ODC) para ornitina. (Bouchereau et al. 1999).

A combinação dos dados do presente estudo com os dados de PAs apresentados anteriormente, permite levantar a hipótese de que a Put pode ter sido sintetizada a partir da arginina, já que este aminoácido foi encontrado em maiores teores, quando comparado com a ornitina em ambos os calos.

Quando comparados os dois tipos de calos observou-se uma maior quantidade de arginina em calos não embriogênicos. Como foi mostrado anteriormente também ocorre uma maior quantidade de Put em calos não embriogênicos. Isto sugere uma correlação entre a maior produção de arginina para suprir uma maior síntese de Put neste tipo de calo. Já em calos embriogênicos a produção de arginina foi menor, proporcional a síntese de Put.

Com relação ao triptofano, foi encontrada uma maior quantidade em calos embriogênicos do que em calos não embriogênicos. Este aminoácido é precursor de AIA endógeno e muitos estudos têm demonstrado que os vegetais convertem triptofano em AIA através de várias rotas (Taiz e Zeiger, 2004). Desta forma, analisado estes dados é possível correlacionar os altos níveis de triptofano em calos embriogênicos com índices maiores de AIA nos mesmos tipos de calos. Isto sugere que maior quantidade de triptofano pode estar associado com a síntese de AIA em calos embriogênicos bem como uma menor síntese de triptofano em calos não embriogênicos poderia estar associada a níveis menores de AIA nesses calos. Em *Vriesea gigantea* observou-se uma síntese maior de AIA endógeno em meios suplementados com triptofano e esse resultado corrobora aqueles obtidos no presente trabalho associando a síntese dessa auxina com este aminoácido (Ambrosini, 2007).

A glutamina foi o aminoácido de maior expressão em ambos os calos, mas isso se deve, também, ao fato de que esse aminoácido foi suplementado no meio de cultura para formação e maturação dos calos, devido sua grande importância para embriogenese somática em varias espécies (Dal Vesco e Guerra, 2001).

Tabela 2.2 Aminoácidos livres ($\mu\text{g/g}$ de MF) em calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha (*Bactris gasipaes*)

Aminoácidos	Tipos de calo	
	Embriogênico	Não embriogênico
Ac. aspártico	371,57 \pm 105,96	402,89 \pm 159,11
Ac. glutâmico	330,20 \pm 115,31	946,12 \pm 389,60
Asparagina	2209,08 \pm 589,82	2856,12 \pm 1855,34
Serina	360,87 \pm 129,32	643 \pm 279,24
Glutamina	63495,74 \pm 20174,92	62515,38 \pm 31641,58
Histidina	374,24 \pm 344,57	1204,91 \pm 1209,95
Glicina	20,01 \pm 3,75	22,08 \pm 11,99
Arginina	167,57 \pm 43,96	260,37 \pm 123,77
Treonina	62,97 \pm 31,61	580,45 \pm 357,14
Alanina	1882,86 \pm 812,94	3169,89 \pm 1937,11
GABA	172,90 \pm 90,11	685,42 \pm 377,05
Tirosina	33,30 \pm 12,56	33,53 \pm 22,55
Triptofano	96,01 \pm 25,33	80,78 \pm 34,36
Metionina	6,61 \pm 2,78	9,89 \pm 1,17
Valina	11,27 \pm 3,23	45,28 \pm 20,28
Fenilalanina	26,35 \pm 7,17	11,65 \pm 5,62
Isoleucina	35,67 \pm 10,56	23,86 \pm 1,98
Leucina	29,06 \pm 8,65	28,34 \pm 5,02
Ornitina	0	0
Cisteína	72,32 \pm 36,30	0
Lisina	137,28 \pm 62,91	245,82 \pm 7,44
Total	69895,90	73765,93

Os dados são representados pelas medias \pm desvio padrão.

6.4 – Fenóis Totais

Quando analisados os fenóis totais expressos em calos embriogênicos e não embriogênicos, observou-se uma diferença significativa entre os dois calos. No calo não embriogênico houve uma maior expressão de fenóis totais do que em calos embriogênicos ($p < 0,05$).

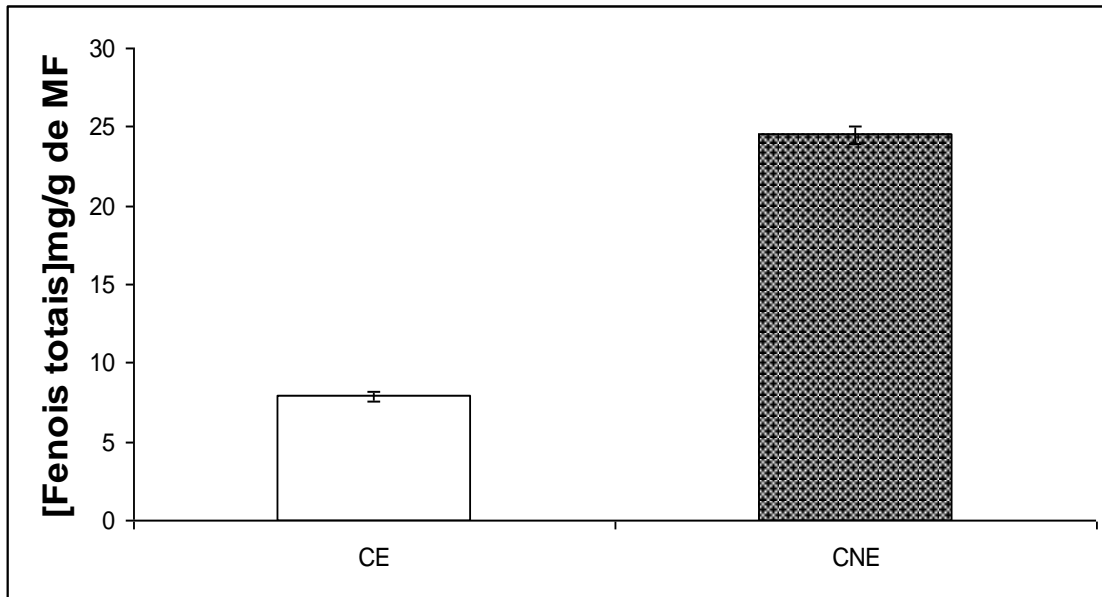


Figura 2.4 Fenóis totais em calos embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) de pupunha (*Bactris gasipaes*) (média \pm desvio padrão, n=3).

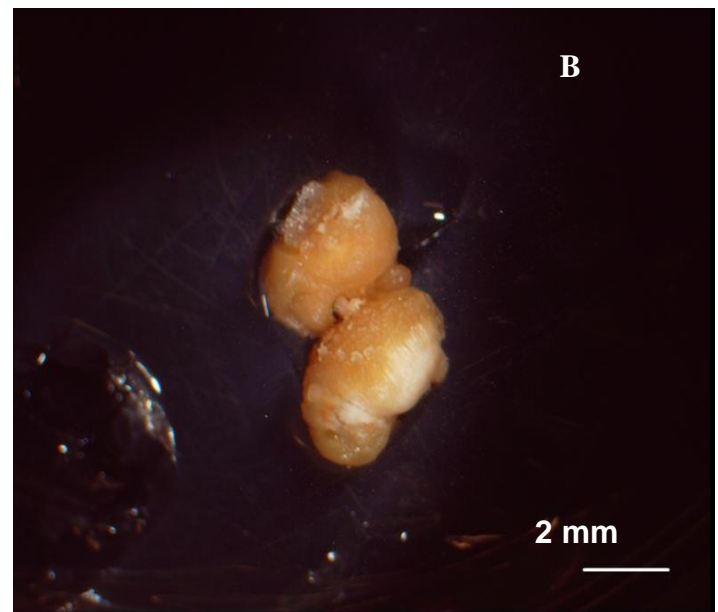
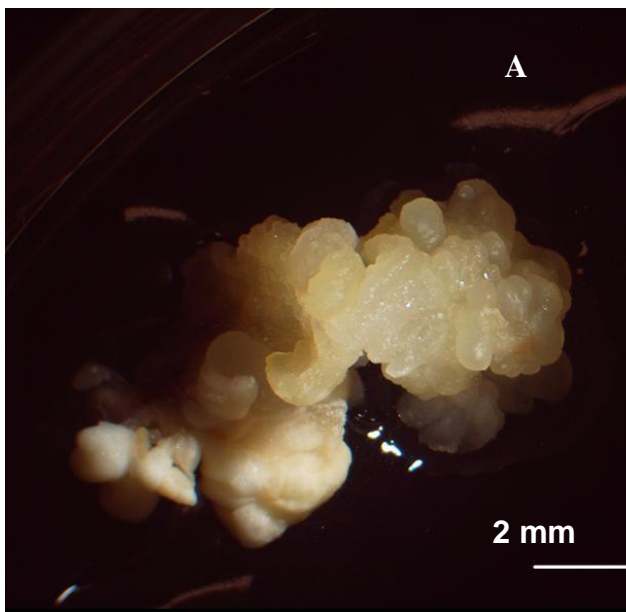


Figura 2.5- Aspectos gerais de calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) **A-** Calo embriogênico. **B-** Calo não embriogênico

7-Conclusões

No presente trabalho foram obtidos resultados expressivos para um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a embriogênese somática de *Bactris gasipaes*. Aspectos relevantes na comparação de calos embriogênicos e não embriogênicos foram identificados. Na análise do metabolismo endógeno os conteúdos endógenos de AIA e ABA são maiores em calos embriogênicos do que em calos não embriogênicos. Alguns autores sugerem que o conteúdo endógeno de AIA esta relacionado a capacidade embriogênica de cultura e é essencial durante o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos e isto confere robustez aos resultados obtidos no presente trabalho. As PAs e, em especial a Putrecina revelaram concentrações superiores em calos não embriogênicos que em calos embriogênicas, sugerindo a relação direta desse hormônio vegetal com um rápido crescimento do calo e não com a capacidade embriogênica. Essa alta quantidade de Put, por sua vez, pode estar correlacionada com os altos teores de compostos fenólicos nesses mesmos calos. Para aminoácidos endógenos observa-se uma associação entre os teores de alguns deles, como arginina e triptofano, para síntese de Put e hormônios endógenos respectivamente, em calos não embriogênicos e embriogênicos. Diante disso pode-se sugerir que esses compostos endógenos, possam ser candidatos a serem considerados marcadores bioquímicos de calos embriogênicos e não embriogênicos.

8-Referências Bibliográficas

- AMBROSINI, A.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; COBALCHINI, N.; FRIEDRICH, L.; PASSAGLIA, L. M. P. Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesia gigantea* Gaudchi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5 (2), p. 1169-1170, 2007.
- ANDERSEN, S.E.; BASTOLA, D.R.; MINOCHA, S.C.. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant Physiology**. v.116, p. 299–30, 1998.
- ASTARITA, L. V.; FHOH, E. I. S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v 47, p. 53-59, 2003.
- BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell Tissue. Organ. Culture**. v. 69, p.1–34, 2002..
- BESSE, I.; VERDEIL, J.L.; DUVAL, I.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany** v. 44 p.983–989,1992.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER ,F.; MARTIN-TANGUY, J.. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**. v. 140, p. 103–125, 1999
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* O. Berg Burret)** 2007 237p , Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Florianópolis:UFSC
- CENTENO, M.L.; RODRÍGUEZ, A.; FEITO, I.; FERNÁNDEZ, B. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and the morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. **Plant Cell Report** v.16, p. 58–62,,1996
- CHAIMSOHN, P. F. Cultivo de pupunha para palmito. Importância, Mercado e aspectos biológicos e agronômicos. In: **Curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito de pupunha**, IAPAR Londrina, p. 7-69, 2001.
- COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, p. 1494–1499, 1993.
- DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen source in Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis.; **Plant cell Tissue and Organ Culture**, p. 19-25, 2001.

DOUGALL, D. K. Biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture II. Further isotope competition experiments using protein amino acids. **Plant Physiology**, v. 41, p. 1411-1415, 1966.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E.; CARRON, M.P. Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole3-acetic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Plant Science** v. 88, p. 91–96, 1993

FAURE, O.; MENGOLI, M.; NOUGARE, DE A.; BAGNI, N. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. **Journal Plant Physiology** v.138, p. 545–549, 1991.

FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**, v. 9, p. 659–669, 1996.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 165–186, 1986.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulat.** v.43, p. 27–47, 2004.

GASLTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology**, v. 94, p. 406-410, 1990.

GALSTON, A. W.; FLORES, H.E. Polyamines and plant morphogenesis. In: R.D. SLOCUM; H. E. FLORES. (EDS) **Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants**. CRC Press, Boca Raton, p. 175-186, 1991.

HAVELANGE, A.; LEJEUNE, P.; BERNIER, G.; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A. W. Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinaps alba* **Physiologia Plantarum**, v. 96, p. 59-65, 1996.

IVANOVA, A.; VELCHEVA, M.; DENCHEV, P.; ATANASSOV, A.; VAN ONCKELEN, H.A. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. **Plant Physiology**, v. 92 p. 85–89, 1994.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 389–395, 2001

KACKAR, A.; SHEKHAWAT, N.S. Plant regeneration through somatic embryogenesis and polyamine levels in cultures of grasses of Thar Desert. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 6(2), p. 121-127, 2007.

KAMADA, H.; HARADA, H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. **Zeitschrift fuer Pflanzen-Physiologie**, v. 91, p. 453– 463, 1979.

KIYOSUE, T.; NAKAJIMA, M.; YAMAGUCHI, I.; SATOH, S.; KAMADA, H.; HARADA, H. Endogenous levels of abscisic acid in embryogenic cells, non-embryogenic cells and somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v.188, p. 343–347, 1992.

KOJIMA, K. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and giberillin-like substances in the flowers and development fruitlets of citrus cultivar “Hyuganatsu “. **Science Horticulturae**, v. 65, p. 263-272, 1996.

KOUAKOU, T.H.; WAFFO, T. P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; TRISTAN, R.; DÉCENDIT, A.; MÉRILLON, J. M.. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29, 2007.

KUMAR, A.; TAYLOR, M.; ALTABELLA, T.; TIBURCIO, A. F. Recent advances in polyamine research. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 124-130, 1997.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Relationship between endogenous hormone levels in grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. **Vitis**, v. 39, p. 151–157. 2000.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulators** v. 47, p. 91–110, 2005

LITZ, R.E.; SCHAFFER, B. Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Plant Physiology**. v,128, p. 251-258, 1987.

LIU C. M., XU Z. H.; CHUA N. H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, p. 621–630, 1993.

MICHALCZUK, L.; DRUART, P. Indole-3-acetic acid metabolism in hormone autotrophic, embryogenic callus of Inmil cherry rootstock (*Prunus incisa* _ *serrula* “GM 9”) and in hormone-dependent, non-embryogenic calli of *Prunus incisa* _ *serrula* and *Prunus domestica*. **Plant Physiology** v.107, p. 426–432, 1999.

MICHALCZUK, L; COOKE, T.J.; COHEN, J. D. Auxin levels at different stages of carrot embryogenesis. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1097– 1103, 1992.

MIFLIN, B.J.; P. J. LEA The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry** . v.15, p. 873-885, 1976.

MONTEIRO, M.; KEVERS, C.; DOMMES, J.; GASPAR, T. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 68, p. 225-232, 2002.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; KOMAMINE, A. ; SHORTLE, W.C. Regulation of DNA synthesis and cell division by polyamines in *Catharanthus roseus* suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 126-130, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

PREWEIN, C.; ENDEMANN, M.; REINO, H.L.V.; SALAJ, J.; SUNDERLIKOV, V.; WIHLM, E. Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. **Trees**, v. 20, p. 53–60, 2006.

RAJASEKARAN, K.; HEIN, M. B.; DAVIS G. C.; CARNES M. G.; VASIL, I. K. Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. **Journal of Plant Physiology**, v.130, p. 13–25, 1987b

RAO, K.V.; SYRASANNA, P.; REDDY, G. M.. Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic calli of Zea mays L. **Plant Science**, v. 66, p. 127-130, 1990.

REED, J.W. Roles and activities of auxin/AIA proteins Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 420-425, 2001.

SASAKI, K.; SHIMOMURA, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 1159–1166, 1994

SCHIAVONE, F. M.; COOKE, T. J.. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, p. 53–62, 1987.

SHOEB, F.; YADAV, J. S.; BAJAI S.; RAJAM, M. V.; Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of Indica rice. **Plant Science**, v. 160, p. 1229-1235, 2001.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, 2004

STEINER, N. ; CATARINA, Claudete Santa ; SILVEIRA, V. ; FLOH, Eny I.s. ; GUERRA, M. P. . Polyamine Effects on Growth and Endogenous Hormones Levels in Araucaria Angustifolia Embryogenic Cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 3, p. 1573-5044, 2007.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE G. C. CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 15–22, 2007b.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, p.1–11, 2007c.

TERZI M.; LOSCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI S. S. **Plant cell culture: applications and limitations**, p. 54-66, 1990.

TIBURCIO, A.F.; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A.W. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. **Plant Cell Physiology** v. 29, p. 1241– 1249, 1988

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª ed.. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.719

TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORREL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 664–674, 1997.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of Graminae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 1, p. 152-157, 1985.

WANG, L.; HUANG, B.; HE, M.; HAO, S. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-62, 1990.

VOLPERT, R.; OSSWALD, W.; ETYSNER, E. F. Effects of cinnamic acids derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v. 38, p. 19–22, 1995.

WANN, S. R.; JOHNSON, M. A.; NOLAND, T. L.; CARLSON, J. A. Biochemical difference between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Report**, v. 6, p. 39-42, 1987.

WANG, L.; HUANG, B.; HEM, H. A.O.S.. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freixia refracta* **Annals of Botany**, v.57, p. 443-62, 1990.

WETHERELL, D. F.; DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 97–103, 1976.

ZHU, M.; XU, A.; YUAN, M.; HUANG, C. H.; YU, Z.; WANG, L.; YU, J. Effects of amino acids on callus differentiation in barley anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 22, p. 201–204, 1990.

CAPITULO III

PROTEÔMA DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes*)

1. Resumo

A embriogênese somática é uma técnica importante para a micropropagação clonal de pupunha. Para um melhor entendimento dos processos que desencadeiam e modulam embriogênese e que servem para promover avanços na investigação da biologia desse processo e suas aplicações biotecnológicas, estudos relacionados com o metabolismo protéico da embriogênese somática e zigótica se fazem necessários. O presente estudo teve como objetivo investigar e caracterizar mudanças no perfil das proteínas expressas durante o desenvolvimento da embriogênese somática e em endosperma e embriões zigóticos de pupunha. Para isto, estágios da embriogênese somática, calos embriogênicos e não embriogênicos, bem como embriões zigóticos e endosperma foram caracterizados por eletroforese bidimensional (2-DE). Durante a embriogênese somática (0, 15, 30 e 60 dias) observou-se um aumento tanto na concentração de proteínas totais quanto no número de spots entre 0 dias (15,68 µg/g de MF) e 15 dias (38,5 µg/g de MF), ficando constante entre 15 e 30 dias com uma subsequente diminuição entre 30 e 60 dias (22,36 µg/g de MF). Algumas proteínas foram exclusivas dos estágios de 15 e 30 dias podendo ser biomarcadoras da embriogênese somática. Em calos embriogênicos e não embriogênicos houve uma maior expressão de proteínas em calos embriogênicos, observando-se 71 spots exclusivos desses calos, 11 de calos não embriogênicos e 128 spots constantes, sendo que alguns deles apresentaram diferença na sua expressão. Perfis protéicos de embrião zigótico e endosperma também revelaram um maior número de proteínas expressas em embriões zigóticos, verificando-se 118 spots exclusivos de embriões zigóticos, 58 spots constantes e 10 spots exclusivos do endosperma. Os resultados obtidos indicam que algumas proteínas possam ser marcadoras de competência embriogênica nesta espécie.

Palavras chaves – Pupunha, embriogênese somática, culturas embriogênicas, embriões zigóticos, perfil protéico.

2- Abstract

Somatic embryogenesis is an important technique for the clonal micropropagation of peach palm. For a better understanding of the processes that trigger and modulate embryogenesis studies related to protein metabolism in zygotic and somatic embryogenesis are needed. This study aimed to investigate and to characterize changes in the profile of proteins expressed during the development of somatic embryogenesis, in zygotic embryos, and endosperm of peach palm. Different stages of embryogenic cultures, embryogenic and non embryogenic callus, as well as zygotic embryos and endosperm were characterized by two-dimensional electrophoresis (2-DE). During the development of embryogenic cultures (0, 15, 30 and 60 days) there was an increase in both the levels of total protein, and the number of spots among 0 and 15 days. The total protein and number of spots was constant between 15 and 30 days with a subsequent decrease between 30 and 60 days. Some proteins were unique to the stages of 15 and 30 days and may be candidates to biomarkers of somatic embryogenesis. Comparing embryogenic and non embryogenic callus it was observed an enhanced expression of proteins in embryogenic callus, and 71 spots were exclusive of those callus, 11 exclusive of non embryogenic callus and 128 were present in both of the callus, some of which showing differences in their expression. Protein profiles from zygotic embryo and endosperm also showed a greater number of proteins expressed solely in zygotic embryos (118 spots), 58 were present in both, and 10 spots were present only in the endosperm. The results indicate that some of those proteins may be markers of embryogenic competence.

Key words - Pupunha, somatic embryogenesis, embryogenic cultures, zygotic embryos, protein profile.

3- INTRODUÇÃO

A pupunha é uma palmeira domesticada, com provável centro de diversidade no sudoeste da Amazônia. São relatadas várias utilizações para a mesma, como produção de palmito, consumo de frutos cozidos, a produção de farinha para consumo humano e animal e produção de óleo.(Clement et al., 1988)

No entanto, devido ao seu longo ciclo vegetativo, auto-incompatibilidade e características recalcitrantes de suas sementes a propagação convencional dessa palmeira apresenta alguns pontos negativos. Diante disso, estudos sobre a embriogênese somática em pupunha são sugeridos com o objetivo de incrementar a taxa regenerativa da espécie. (Ária e Huete, 1983)

Embriogênese somática refere-se ao processo pelo qual células somáticas podem recuperar o potencial embriogênico e formar embriões viáveis por meio de uma reprogramação da expressão genética. A embriogênese somática segue um padrão morfológico semelhante aos dos embriões zigóticos formados após a fertilização da célula ovo (Zimmerman 1993; Goldberg et al., 1994). Embriões zigóticos são de difícil acesso, pois são muito pequenos, e altamente protegidos pelos tecidos maternos. A embriogênese somática não sendo limitada pela quantidade de embriões ou pela acessibilidade é amplamente investigada porque oferece um sistema modelo para estudar diferentes aspectos relacionados com o processo de desenvolvimento da planta. Além disso, para muitas espécies, as culturas embriogênicas são os materiais alvos mais adequados para transformação genética. No entanto, o sucesso na iniciação e regeneração de calos embriogênicos através da embriogênese somática esta diretamente relacionada com o genótipo. Assim, uma melhor compreensão da embriogênese somática poderia permitir novas estratégias de cultura *in vitro* para propagação de plantas e manipulação genética (Marsoni et al., 2007)

Estudos correlacionados ao desenvolvimento de embriões somáticos estão focados principalmente na área da fisiologia descritiva ou em tecnologias de melhoria do cultivo. Mais recentemente, esforços têm sido feitos para descrever a embriogênese ao nível celular e molecular, utilizando abordagens de proteômica e transcriptômica, em várias espécies de plantas, tais como *Medicago sativa* (Aleith e Richter 1990; Giroux e Pauls 1997; Thibaud-Nissen et al., 2003), *Medicago truncatula* (Imin et al. 2004), *Arachis hypogaea* (Rani et al., 2005), *Cupressus sempervirens* (Sallandrouze et al., 1999), *Vitis vinifera* (Giannazza et al., 1992) *Picea glauca*

(Stasolla et al., 2004) e *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2006). Abordagens deste tipo possibilitam a descrição e o estudo de mudanças ocorridas na expressão do genoma devido as alteração das condições de cultura (Lippert et al., 2005).

Os estudos proteômicos tratam de analisar o perfil das proteínas totais de células específicas, organelas ou tecidos (Blackstock e Weir, 1999). Esses estudos foram inicialmente baseados em proteínas complementares de células específicas ou amostras de tecidos. A proteômica permite avaliar várias propriedades das proteínas, tais como o perfil das modificações pós-tradução ou interação com outras biomoléculas. Um dos objetivos mais comuns dos estudos contemporâneos é a caracterização das diferenças entre os níveis de expressão das proteínas em diferentes tecidos (Fitzgerald, 2001).

A técnica 2-DE consiste em separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico seguido do peso molecular dando lugar a comparação do conteúdo de cada uma das proteínas, produzidas em diferentes células ou tecidos e em diferentes estados fisiológicos. A identificação das proteínas cuja expressão sofreu uma alteração significativa e a análise das modificações das proteínas que ocorrem pós-tradução possibilita a obtenção de dados que indiquem envolvimento em processos biológicos, ou também determinar seu movimento, funcionalidade e atividade, eventos fundamentais para a compreensão de rotas de regulação ligadas às respostas celulares a sinais ambientais (Santos et al., 2004).

Os protocolos para a realização da técnica são bem estabelecidos, variando em detalhes específicos a cada espécie analisada. Existe uma seqüência básica de atividades necessárias para a realização da análise proteômica quantitativa, utilizando 2-DE como meio de separação das proteínas (Santos et al., 2004) (Figura 3.1)

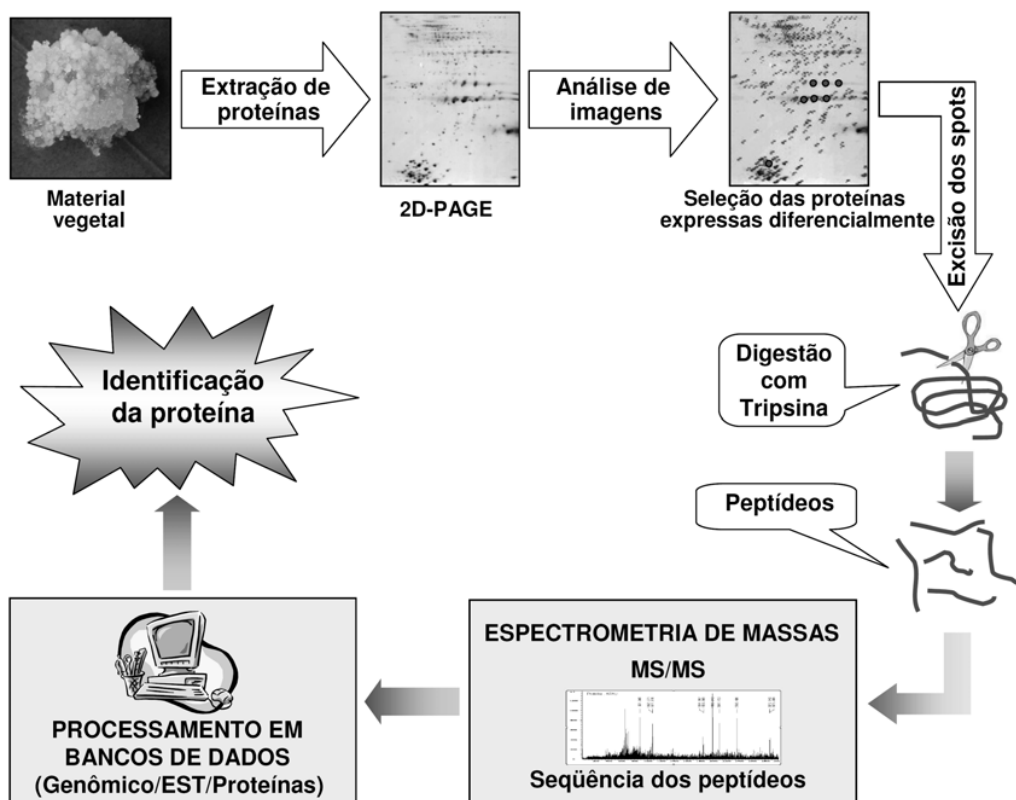


Figura 3.1- Etapas da análise proteômica em plantas, usando a interface eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa MS/ MS

O conhecimento da expressão de proteínas e quais proteínas são expressas é de fundamental importância para um melhor entendimento dos processos que desencadeiam o desenvolvimento do embrião (Lippert et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil protéico de embriões zigóticos e da embriogênese somática da pupunha com intuito de identificar e comparar marcadores protéicos durante esses processos, bem como estudar a dinâmica de síntese e acumulação de proteínas ao longo da ontogênese embrionária.

3.1 Objetivos específicos

- Quantificar e caracterizar as proteínas expressas durante a calogênese;
- Quantificar, caracterizar e comparar as proteínas expressas em calos não embriogênicos e calos embriogênicos
- Quantificar, caracterizar e comparar as proteínas expressas em embriões zigóticos e endosperma;

4- Material e Métodos

4.1- Material vegetal

Para os estudos de proteômica do embrião zigótico e embriogênese somática de pupunha foram utilizadas sementes oriundas de plantas de polinização aberta da população Yurimanguás. As sementes foram fornecidas pelo Sr. Calos Antônio Moura de Toledo, proprietário de um plantio comercial de pupunha, situada em Rondônia, e enviadas por correio.

4.2–Indução da embriogênese somática

Embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura basal de MS (Murashige e Skoog, 1962). A metodologia para meio de cultura e indução de calos encontra-se descrito nos itens 4.3 do capítulo II.

Para estudos com calos embriogênicos e não embriogênicos, foram utilizados 300 mg de calos com 6 semanas de cultivo (figura 3.2). Esse material foi cultivado e liofilizado na universidade de Hamburgo (Alemanha) em parceria com o doutorando Douglas Steinmacher e enviados para UFSC. Foram realizadas 3 repetições para cada amostra vegetal.

Nas análises do perfil protéico relacionado ao desenvolvimento da calogênese, essa foi induzida a partir de embrião zigótico e as análises foram realizadas aos: 0 dias (embrião zigótico), 15 dias, 30 dias e 60 dias de cultivo (figura 3.7 A,B,C eD). Nesse último estágio foram selecionados somente calos que não adquiriram competência embriogênica. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3-Extração das proteínas solúveis

Para extração das proteínas solúveis, foi utilizado o método descrito por Carpentier et al. (2005) com modificações. Foram utilizadas para extração, 300mg de massa fresca de material vegetal. Estes foram liofilizados e macerados com Nitrogênio Líquido. Com auxílio de uma micropipeta 2 ml de tampão Tris-HCl de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,8; EDTA 5mM; KCl 100 mM; DTT 1% (v/v); Sacarose 30%; PMSF (2

mM) foram adicionados ao pó ainda do gral, e então transferido para um tubo falcon (15 ml), onde foi homogeneizado por 30s no vórtex e então adicionado 2 ml de Tampão Fenol ultra-puro Saturado (Invitrogen®), antes da centrifugação a 6000 rpm por 3 min à 4°C, a amostra foi homogeneizada por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, a fase fenólica (Superior) foi coletada. O procedimento foi repetido para re-extração a partir da fase fenólica. Após coletar a segunda fase fenólica foi adicionado acetato de amônio (100 mM) em metanol, até completar o volume total do tubo falcon. Após precipitação “overnight” em freezer -20°C, foi centrifugado a 6000 rpm por 30 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet lavado 4 vezes com acetona/ 0,2% DTT, incubando por 30 min a -20 °C durante as operações de lavagem, seguida de centrifugação a 6000 rpm por 30 min à 4 °C. Em seguida o pellet foi seco ao ar em temperatura ambiente, e ressuspensionado com 100µl de tampão de solubilização (Uréia 7M; Tiouréia 2 M; DTT 1% Pharmalyte 0,5%, Triton-100 2%, PMSF 2 mM) As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da quantificação.

4.4- Quantificação das Proteínas

A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram coletados 10 µl da amostra e separada em um tubo eppendorf, onde foi adicionado 10 µl de tampão de solubilização, e 2 ml de solução de Bradford 20% (v/v) em água ultrapura. As amostras foram colocadas em repouso, no escuro, por 5 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV1230) a 595 nm. Como branco foi utilizado 20 µl de solução de solubilização. Todas as análises foram realizadas em triplicata com base na curva padrão de albumina de soro bovino ($y = 0,0009x + 0,0279$; $R = 0,987$).

4.5- Eletroforeses Bidimensionais (2-DE)

A eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Carpentier et al. (2005). O equivalente a 400 µg de proteínas foi ressuspensionado em 250 µl tampão de rehidratação (Uréia 7 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; Triton 2%, IPG buffer (0,5%); azul de bromofenol 0,002%; DTT 1%), para tiras desidratadas (IPG dry strips) de 13 cm, com gradiente de pH de 3 a 10, mantidas em repouso por 12 h. A eletrofocalização (IEF-1ª dimensão) das proteínas no gradiente de pH, foi realizada em

Ettan IPGPhor (General Electric Healthcare) a 20°C com limite de corrente de 50mA/strip. Durante 2hr e 30 min, a voltagem foi de 300V, então em modo gradiente passou para 1000 V por 30 min em modo gradiente aumentou para 5000V por 1 h e 20 min. A 5000V permaneceu durante 30 min. Totalizando, aproximadamente, 6500 Vh.

Para a segunda dimensão, as tiras foram tratadas em 3 ml de solução de equilíbrio (Tris-HCl 1,5M pH 8,8; Uréia 6M; Glicerol (30%); SDS (2%); Azul de bromofenol (1%)) contendo de DTT (125mM) durante 20 minutos, em seguida por mais 20 min na mesma solução de equilíbrio contendo 125 mM de iodoacetamida. As tiras equilibradas, contendo as proteínas, foram fixadas ao gel SDS de eletroforese com agarose 0,5%. A separação das proteínas de acordo com o peso molecular (2º dimensão) foi realizada em gel de poliacrilamida SDS 12%, com 1,5 mm de espessura. A corrida eletroforética se deu com 12,5mA/gel por 30 min, e 25mA/gel por 6 h aproximadamente. O marcador protéico padrão de peso molecular utilizado, foi com peso molecular de 6,5 a 196 kDa (Bio Rad).

Os géis foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada (38%) por 12 h e posteriormente corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250 por 48 h. Posteriormente eles foram neutralizados com tris base 0,1M com pH 6,5 por 3 min, estabilizados com sulfato de amônio 20% e descorados com ácido acético 1% (v/v). Os géis foram armazenados em solução de ácido acético 0,1% a 4°C.

4.6- Análise dos géis

A análise das imagens digitalizadas por Image scanner de alta resolução foram realizadas utilizando o software Image Master 2D Platinum, versão 6.0, que permite detecção, quantificação e a congruência entre os múltiplos géis. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando exibida uma variação de ± 2 vezes e foram consideradas significativas pelo teste Tukey com 95% de significância.

Para visualizar a expressão dos volumes nos diferentes estádios da embriogênese, foi construída uma matrix de similaridade e agrupamento, onde um estágio foi comparado com seu estágio anterior, usando o software GENESIS (versão 1.7.2 Graz University of technology, institute for genomics and Bioinformatic, Áustria, www.genome.tugraz.at).

5- Resultados e Discussão

Perfil protéico de calos embriogênicos e não embriogênicos

Calos embriogênicos apresentaram valores menores de proteínas totais (24,11 µg/g de MF) do que calos não embriogênicos (43,40 µg/g de MF) (Figura 3.4a). No entanto o perfil protéico na eletroforese bidimensional mostrou uma quantidade superior de spots em calos embriogênicos, levando a crer que apesar dos calos embriogênicos possuírem uma quantidade menor de proteínas totais essas se encontram mais diversificadas que as proteínas presente em calos não embriogênicos.(Figura 3.3 a e b)

Para esta mesma espécie, Steinmacher (2005) não observou diferenças significativas no perfil protéico entre calos primários (os quais apresentam coloração amarela para amarelo escuro e mostram crescimento desorganizado) com características embriogênicas e calos que não apresentaram competência embriogênica. Por outro lado, nos calos embriogênicos nodulares foi observada a presença de duas bandas protéicas de alto peso molecular (em torno de 97, 4 KDa). No presente estudo ao observar as proteínas expressas nesse peso molecular em gel 2-DE observou-se um maior numero de proteínas em calos embriogênicos (Figura 3.3a). Observou-se também expressiva diferença de expressão de alguns spots quando comparados com calos não embriogênicos. (Figura 3.3b). Em *Saccharum* sp., foram encontradas diferenças entre calos embriogênicos e não embriogênicos, sendo observadas duas bandas de 65 e 67 KDa apenas em calos embriogênicos (Guiderdoni et al., 1995). Esses autores sugeriram que essas sejam proteínas de reserva acumuladas nos primeiros estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Da mesma forma, embriões somáticos de *E. guineensis* acumularam proteínas de reserva com peso molecular variando entre 45 KDa e 65KDa (Morcillo et al., 1998).

As análises das imagens no Image Master Platinum detectaram mais de 500 spots reprodutíveis em gel de comassie Blue ao longo de uma faixa de pH 3-10 e pesos moleculares de 6 a 190KDa. Desses spots 332 foram detectados em calos embriogênicos e 198 em calos não embriogênicos (Figura 3.3 a e b). Foram observados também spots exclusivos de CE (71 spots), uma menor quantidade de

spots exclusivos de CNE (11spots) e aqueles que foram comuns em ambos os calos (128 spots). (figura 3.5)

Dessas proteínas comuns, a maior parte apresentou expressão constante e algumas tiveram diferença de expressão (15 spots) ao comparar os dois calos, sendo que sete apresentaram sua expressão aumentada e oito sua expressão diminuída quando comparado calos embriogênicos versus calos não embriogênicos (Figura 3.6). Resultados similares foram encontrados em *Medicago truncatula* e *Picea glauca* (Imin et al 2005; Lippert et al. 2005)

De uma forma geral os spots de calos embriogênicos e calos não embriogênicos se dispuseram de forma semelhantes nos géis. A maioria dos spots apresentou ponto isoelétrico entre 5-7 e peso molecular entre 40-80KDa (Figura 3.4 b e c). A diferença ocorreu com relação às proteínas exclusivas dos dois géis, sendo que em calos embriogênicos elas se apresentaram dispostas, na sua maioria, entre o pH 6 e 7 e peso molecular entre 30 e 50 KDa. Já, em calos não embriogênicos os spots estiveram presentes, na sua maioria, entre pH 5 e 6 com pesos moleculares entre 48 a 78KDa. Em *Oriza sativa* (Dodeman e Ducreux, 1996), muitas proteínas exclusivas de calos embriogênicos foram detectadas entre 40 e 44KDa, e proteínas exclusivas de calos não embriogênico em torno de 24KDa, resultados estes divergentes daqueles obtidos no presente trabalho.

A diferença mais expressiva entre os dois calos relaciona-se com o número de spots exclusivos em calos embriogênicos e essas proteínas exclusivas são de grande importância, pois podem ser candidatas a serem marcadoras de competência embriogênica.

De acordo com Feher (2003), de-diferenciação e subsequente embriogênese somática estão associadas com mudanças complexas no padrão de proteínas. Mudanças no metabolismo celular e a iniciação de um novo programa de desenvolvimento geram a necessidade de novas proteínas que devem ser adequadas para garantir que suas funções sejam executadas. Essas modificações são controladas por proteínas que apresentam atividades chaperonas, incluindo as proteínas de choque térmico (Fehér, 2003). Diante disso acredita-se que calos com competência embriogênica durante seu processo de de-diferenciação são capazes de produzir o pool necessário de proteínas para que as funções sejam executadas, o que não ocorre em calos não embriogênico visto que o pool de proteínas produzidas é inferior quando comparado com calos embriogênico.

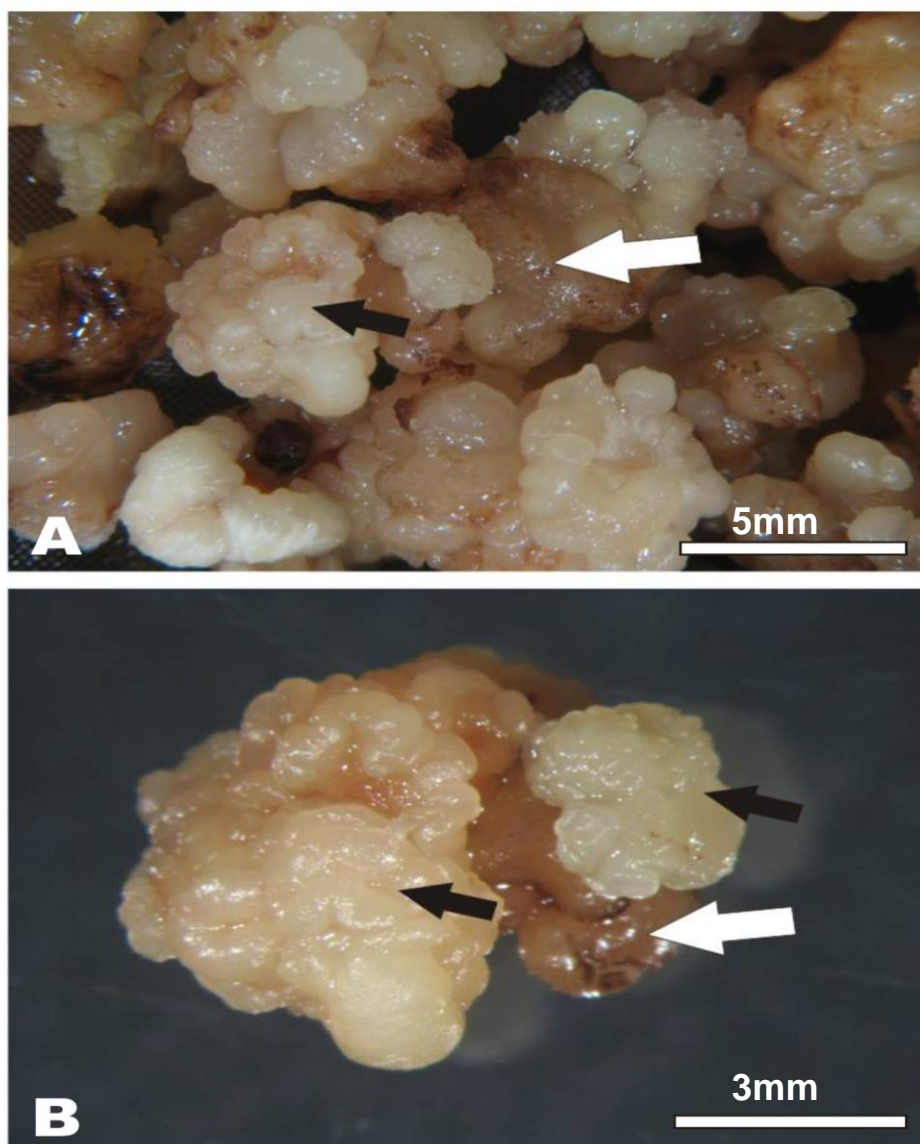


Figura 3.2 – Calos de pupunha (*Bactris gasipaes*) **Setas pretas**- calos com competência embriogênica **Setas Brancas**- Calos sem competência embriogênica

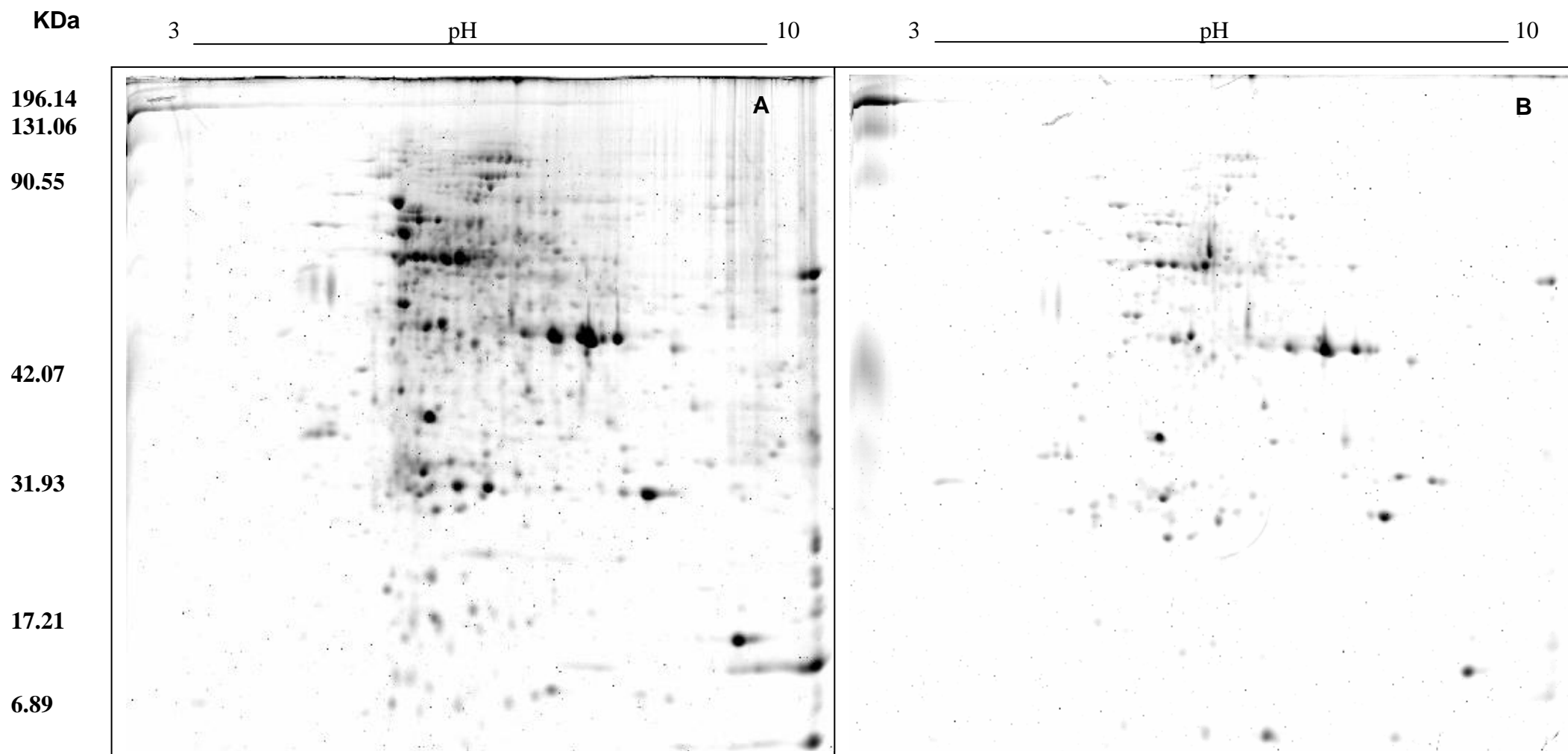


FIGURA 3.3– Perfil protéico de calos de pupunha. (*Bactris gasipaes*) **A**- Perfil protéico de calos embriogênicos **B**- Perfil protéicos de calos não embriogênicos

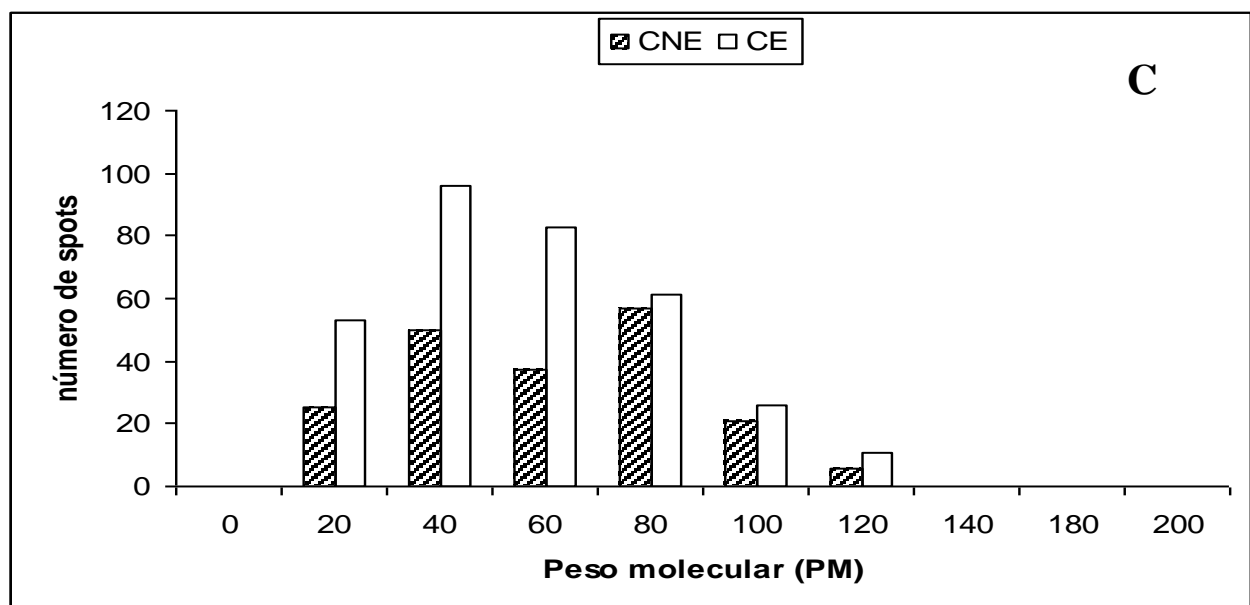
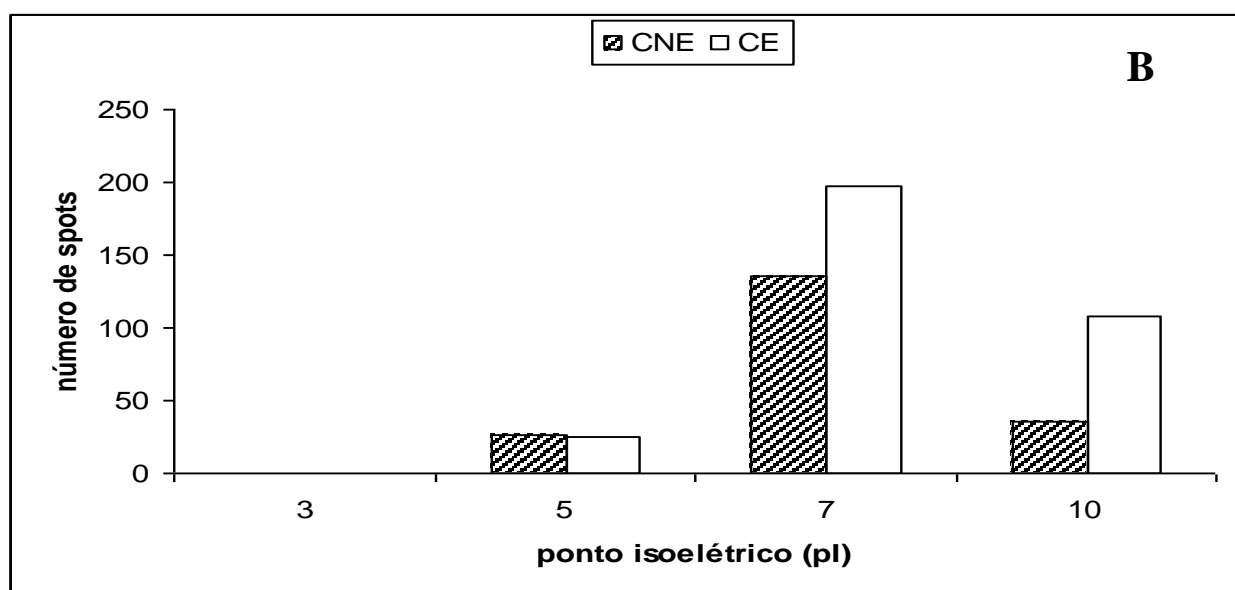
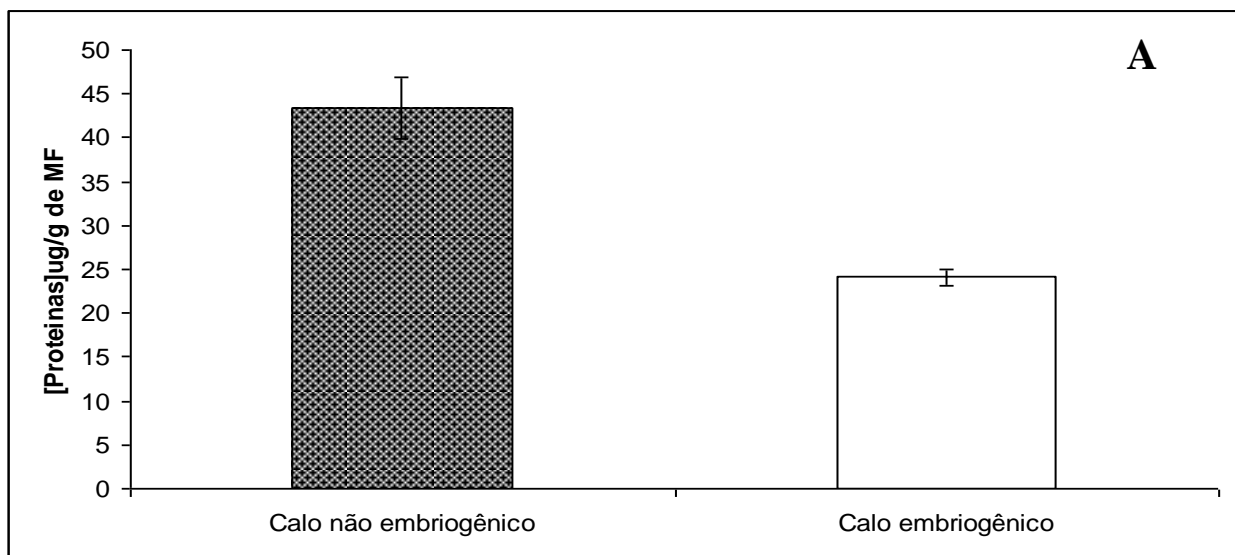


FIGURA 3.4 – A- Proteínas totais (ug/mg MF) nos dois tipos de calos: embriogênicos (CE) e não embriogênicos (CNE) **B-** Distribuição dos pI das proteínas expressas em calos embriogênicos e não embriogênicos **C-** Distribuição dos PM das proteínas expressas em calos embriogênicos e não embriogênico.

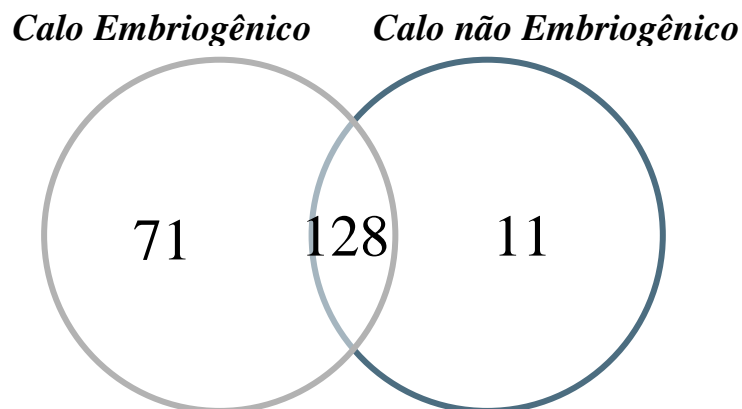


Figura 3.5 – Número de proteínas exclusivas de calos embriogênicos, exclusivas de calos não embriogênicos e comuns em ambos os calos.

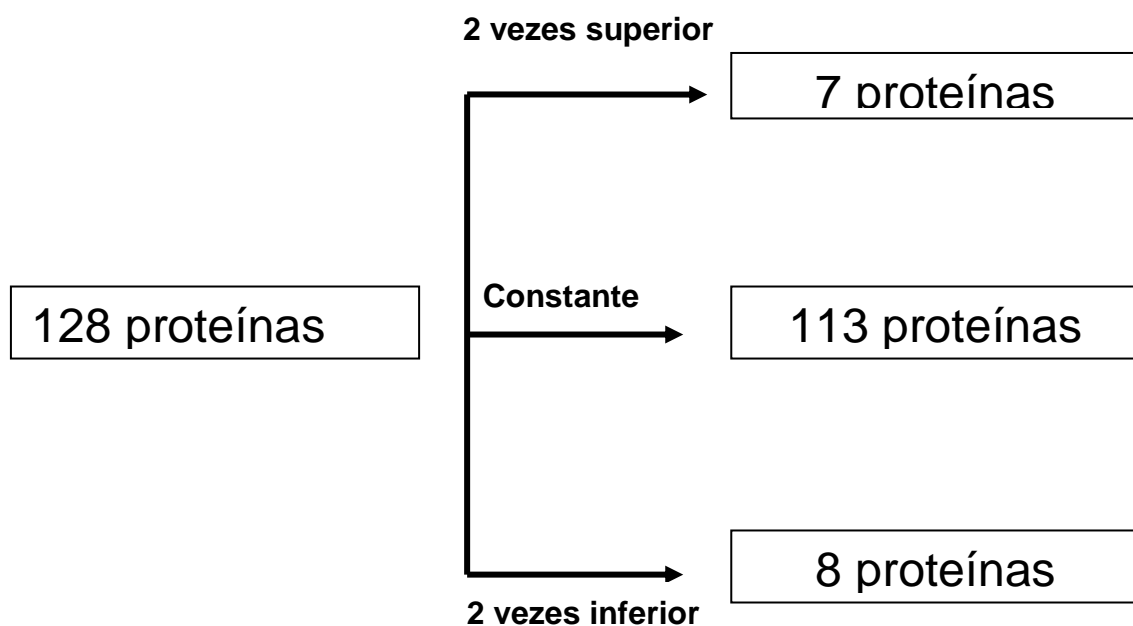


Figura 3.6- Diferença de expressão das proteínas comuns em calos embriogênicos versus não embriogênicos de pupunha (*Bactris gasipaes*)

Perfil protéico durante calogênese de pupunha

Durante a calogênese pode-se observar uma variação na expressão das proteínas. Em embriões zigóticos (0 dias) os níveis protéicos foram de 15,68µg/g de MF, observando-se um aumento estatisticamente significativo aos 15 dias (38,5 µg/g de MF). Aos 30 dias a concentração de proteínas permaneceu constante (38,75 µg/g de MF) seguido de uma diminuição estatisticamente significativa as 60 dias (22,36 µg/g de MF) (Figura 3.9a). Em *Pinus taeda* também foi observada alteração similar na expressão de proteínas em culturas embriogênicas (Silveira et al 2004). Esse aumento entre os 0 e 15 dias de cultura, no presente estudo pode ser relatado como uma alta atividade mitótica durante as fases de crescimento linear e exponencial. Um aumento nos níveis de proteínas em células de *Larix leptoeuropaea* durante as duas primeiras semanas de culturas seguido por um decréscimo deste conteúdo durante as semanas seguintes foi também relatado por Gutmann et al. (1996). Ainda de acordo com Silveira (2004), o ciclo celular é dependente da síntese de novas proteínas que trazem mudanças morfológicas e bioquímicas associadas à atividade mitótica.

No presente trabalho, comparando-se os pl e PM dos spots dos quatro estádios de desenvolvimento observou-se que as proteínas se dispuseram de forma semelhante entre os estádios, estando presente na sua maioria entre pl de 5 a 10 e apresentando maior números de spots em pl,-7. e PM entre 20 e 80KDa, sendo que em 40KDa observou-se um maior número de proteínas. Aos 60 dias houve uma diferença na disposição dos spots com relação PM dos outros estádios apresentando um maior numero de proteínas em 60KDa (Figura 3.9b C).

Durante os quatro estádios a análise de imagem revelou que mais de 850 proteínas foram reprodutíveis em géis corados com Comassie Blue ao longo de um pH 3-10 e um peso molecular de 6-196KDa (Figura 3.8A,B.C.e D). O número médio de spots mudou com os estádios de desenvolvimento, variando de 258 spots no dia zero para 104 spots aos 60 dias e atingindo o maior número de spots (296) aos 30 dias. Serra et al. (2000) sugeriram que o declínio no teor das proteínas em calos de *Bertholletia excelsa* h. B. K. pode estar relacionado com a fase de desaceleração da curva de crescimento da cultura, momento em que há redução de nutrientes no meio de cultura e o acúmulo de substâncias tóxicas.

Quando comparadas as proteínas presentes no primeiro estágio (dia zero) com as proteínas do segundo estágio (15 dias) observaram-se 62 spots exclusivos do

primeiro estágio e 78 do segundo. Seguindo o desenvolvimento da embriogenese somática ao comparar o segundo estágio (15 dias) com o terceiro (30 dias), também foram observados spots exclusivos de ambos os estágios, 9 e 31 spots respectivamente. O maior número de spots exclusivos foi obtido ao comparar os dois últimos estágios, 30 e 60 dias com 129 e 2 spots respectivamente (Figura. 3.10)

Acredita-se que essas diferenças na expressão das proteínas nos diferentes estágios estão relacionadas com a modulação das diferentes fases da embriogenese somática. Vários estudos sobre esta rota morfogênética descrevem a variedade de genes que são ativados ou diferencialmente expressos durante o processo. Apesar de numerosos genes já terem sido identificados com expressos especificamente durante a embriogenese somática (Mordhorst et al., 1997; Chugh e Khurana, 2002), as tentativas de identificar precocemente o genes que controlam o embrião têm resultado em sucesso limitado (Boutilier et al., 2002).

Em *Acca sellowiana* durante os diferentes estágios do desenvolvimento dos embriões somáticos foram detectados 181 spots, sendo uma proteína expressa exclusivamente no estágio torpedo, quatro expressas no estágio pré-cotiledonar e nove no cotiledonar. Os autores sugeriram que poucos genes foram envolvidos no controle de histodiferenciação e morfogêneses dos embriões somáticos e que a expressão desses genes ocorreu prioritariamente para modificações morfológicas (Cangahuala-Inocente et al., 2009).

No presente trabalho, 72 apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos, diferença essa aceita quando é exibida uma variação de ± 2 vezes o volume do spot.

Ao observar a representação gráfica das modificações dos volumes (Figura 3.11), encontraram-se dois grandes grupos: no primeiro as proteínas apresentam uma menor expressão nos primeiros estágios de desenvolvimento; no segundo grupo esses valores se inverteram, com as proteínas apresentando uma maior expressão nos primeiros estágios.

Algumas proteínas foram exclusivas do início da calogênese (16, 18, 19 e 47) apresentando maior intensidade no dia zero, enquanto que outras tiveram maior expressão aos 15 dias, comparativamente ao dia zero (34, 35 e 45). Outras proteínas foram expressas somente nos períodos de 15 e 30 dias (54, 55, 56,57), podendo ser consideradas marcadoras de calogênese e responsáveis pela alta atividade mitótica. Para calos sem capacidade embriogênica (60 dias) algumas proteínas apresentaram

uma maior expressão, dentre elas 68,8, 53,60,28,24,61,66 e 70 e assim, essas proteínas poderiam ser consideradas como inibidoras da capacidade embriogenica.

Além das proteínas que foram exclusivas no início ou no final da calogênese outras tiveram sua intensidade diminuída (24 spots), ou aumentada (4 spots) no decorrer do processo. Em *Mendicato truncatula* foram identificadas pequenas cadeias de proteínas Rubisco que foram gradualmente diminuídas durante a embriogênese somática (Imin et al., 2005). Acredita-se que a diminuição dessas proteínas possa estar associada ao processo de desdiferenciação e proliferação celular. Nesse mesmo estudo as proteínas chaperonas, em geral, mostraram uma diminuição nos últimos estádios da embriogênese, sugerindo que a maior expressão das chaperonas é necessária para manutenção da atividade celular durante o início da cultura.

Em *Citrus sinensis* durante a embriogênese somática também foram observadas mudanças na expressão de algumas proteínas e 24 delas tiveram diferenças na sua expressão. Destas, 11 tiveram sua expressão aumentada, nove diminuída enquanto que quatro, aumentaram e posteriormente diminuíram mudando sua expressão no decorrer do processo. Dentre essas proteínas dois spots foram identificados como sendo duas formas de uma mesma ferritina -3. Estas duas formas podem ter sofrido modificações pós transcricionais devido seus diferentes pI e pesos moleculares similares. Três proteínas foram identificadas como membros da família glutathione S-transferase. De acordo com suas funções bioquímicas a maioria das 24 proteínas podem estar envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, divisão celular, fotossíntese e desintoxicação, como sugerido por Pan et al. (2009).

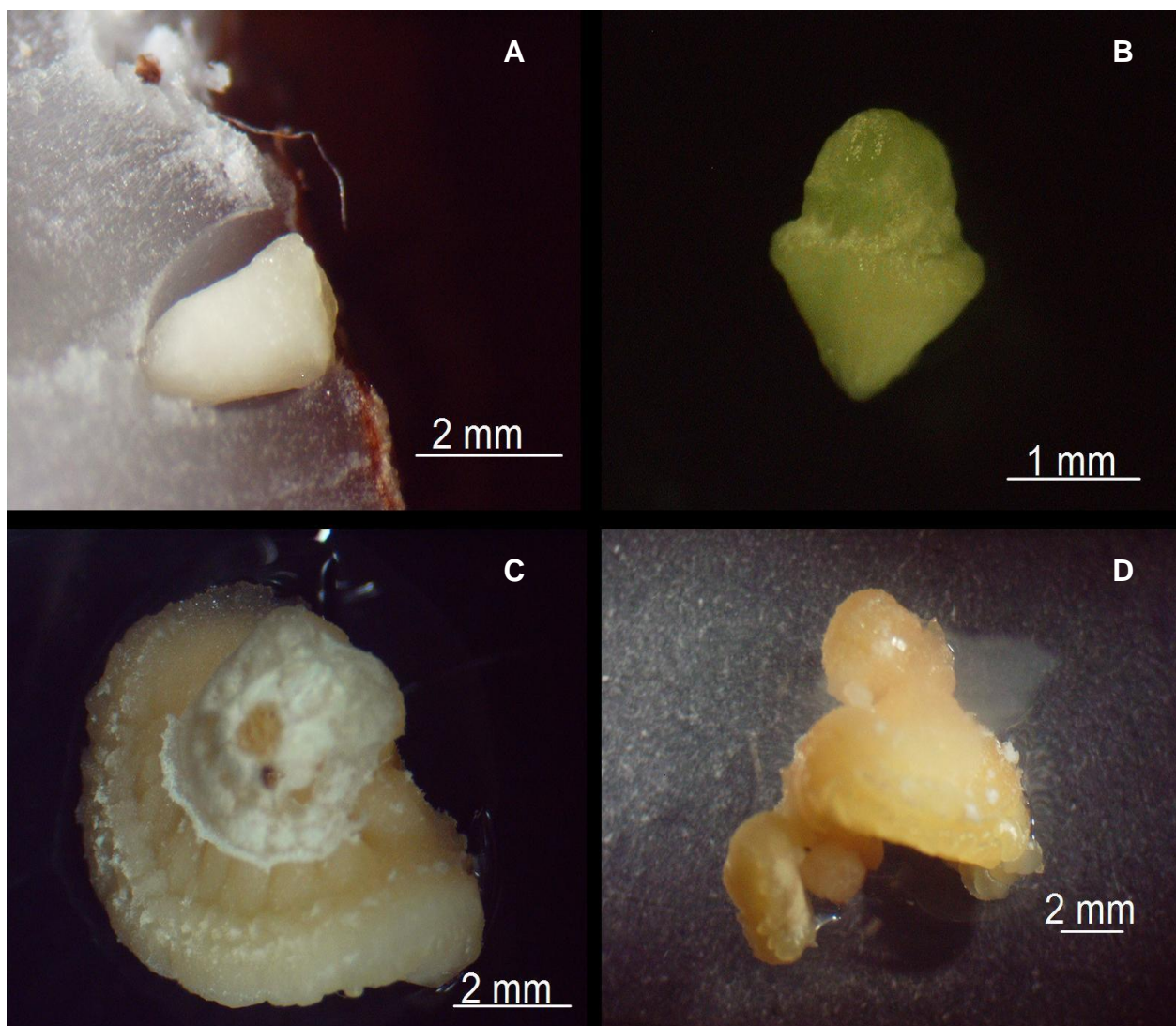


Figura 3.7- Diferentes estádios da calogênese de pupunha (*Bactris gasipaes*). **A-** Embrião zigótico **B-** Embrião zigótico com 15 dias de cultivo **C** – Calos com 30 dias de cultivo **D-** Calo não embriogênico com 60 dias de cultivo.

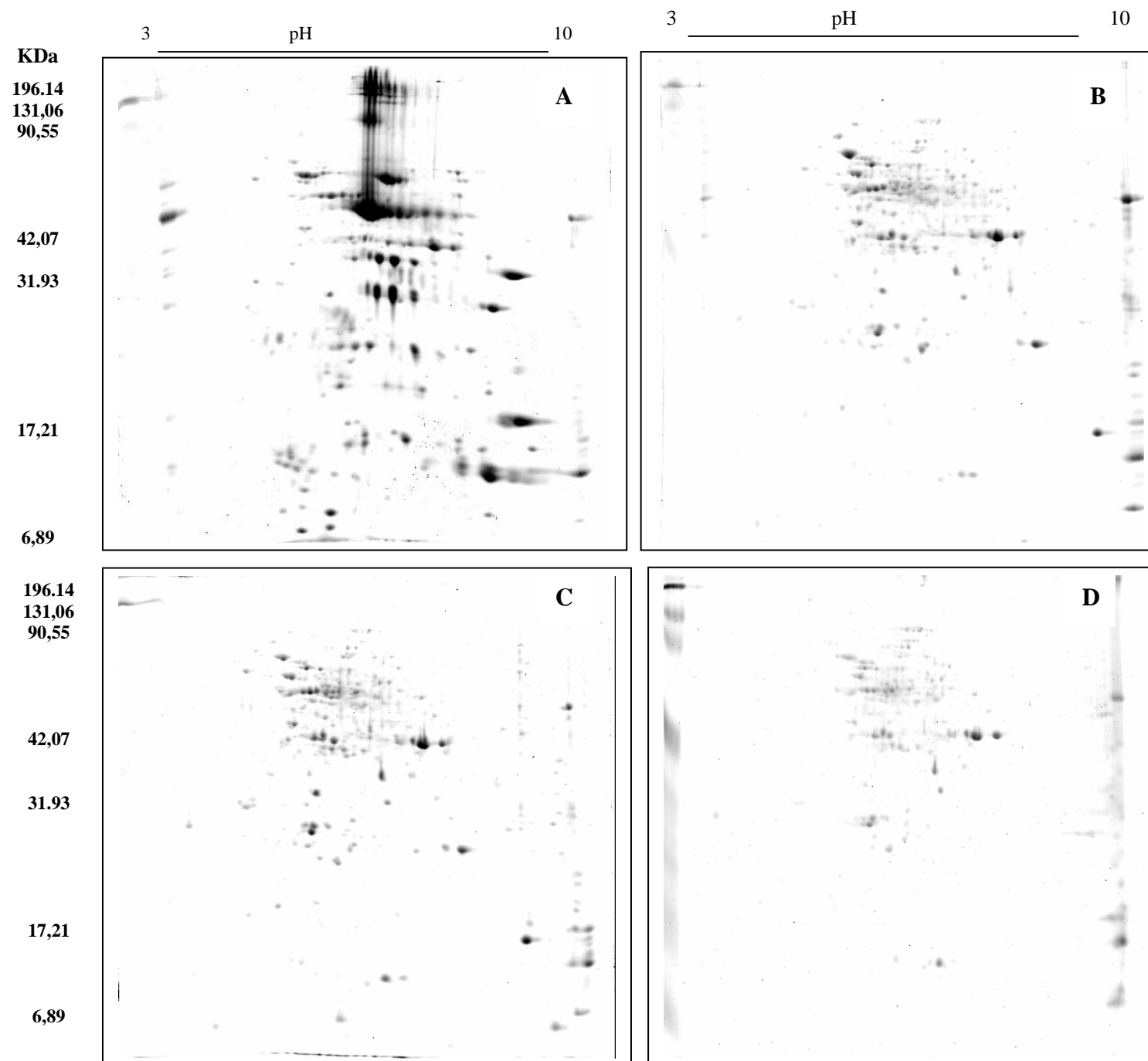


Figura 3.8- Perfil protéica dos diferentes estádios da calogênese de pupinha **A-** Embrião zigótico **B-** 15 dias de cultivo **C-** 30 dias de cultivo **D-** 60 dias de cultivo.

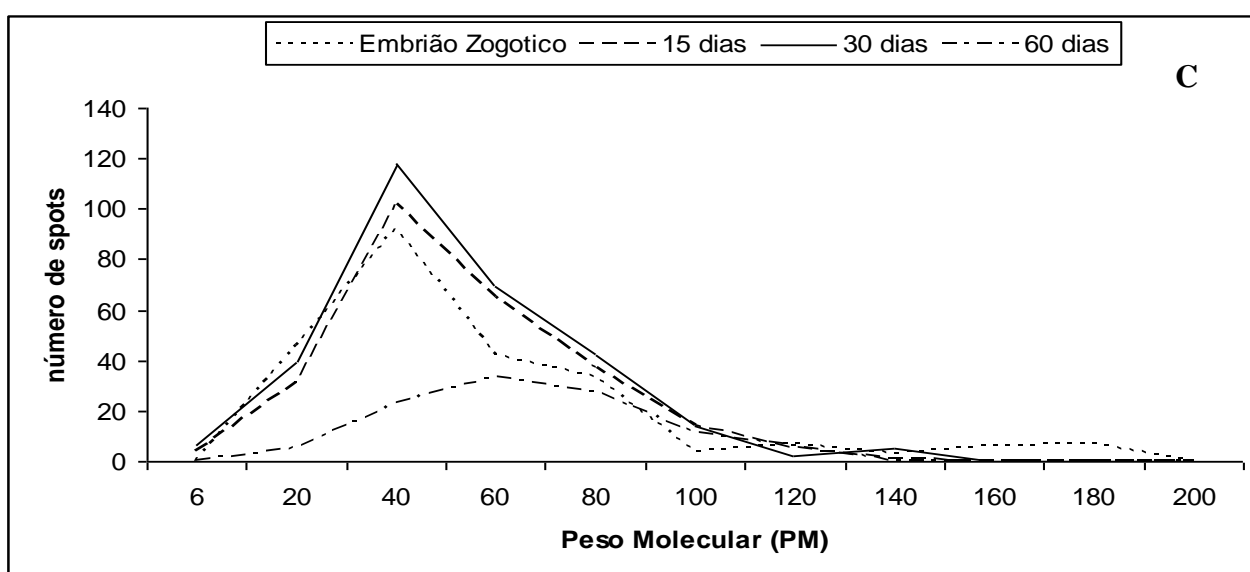
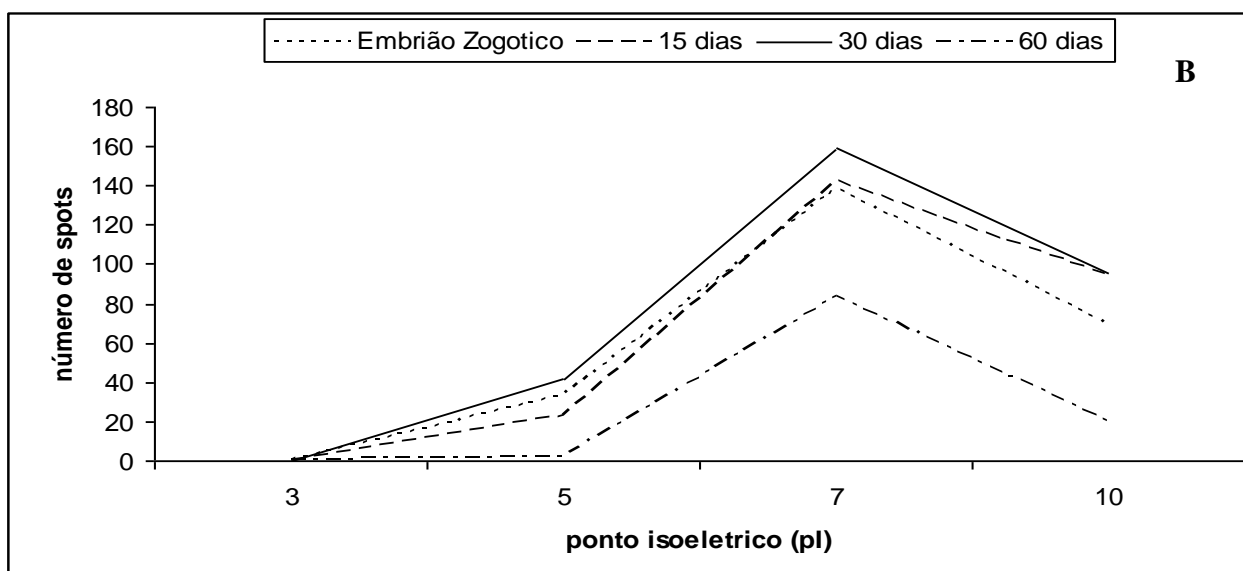
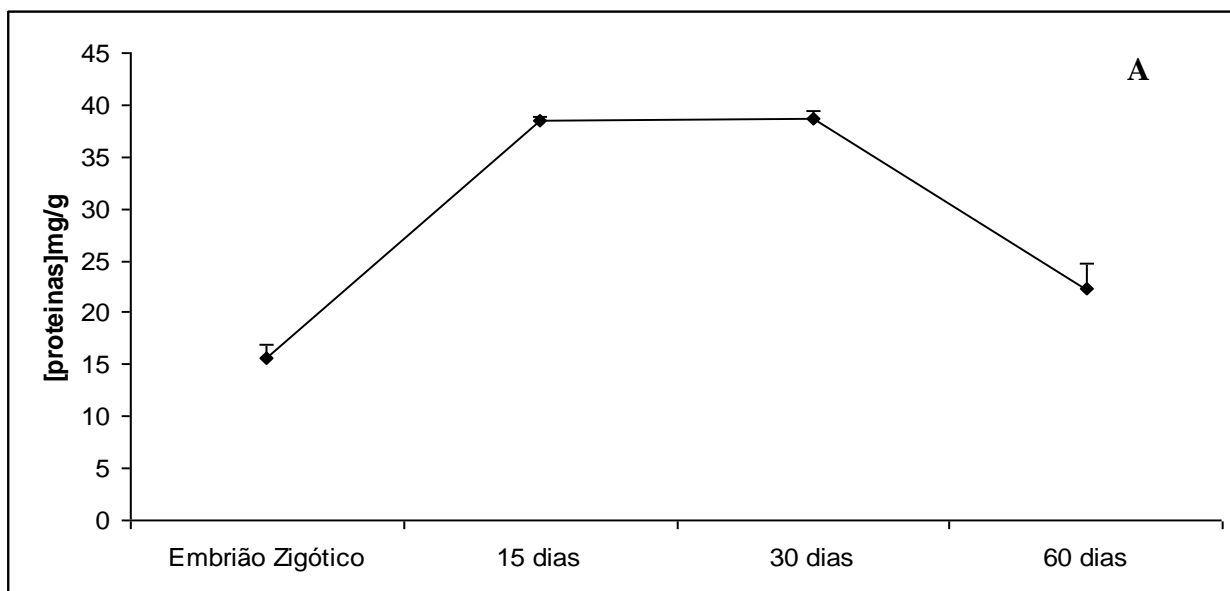


Figura 3.9- A- Proteínas totais (ug/mg MF) nos diferentes estádios da calogênese C- Distribuição dos PM das proteínas expressas nos diferentes estágios da calogênese. (EZ, 15, 30 e 60 dias de cultivo).

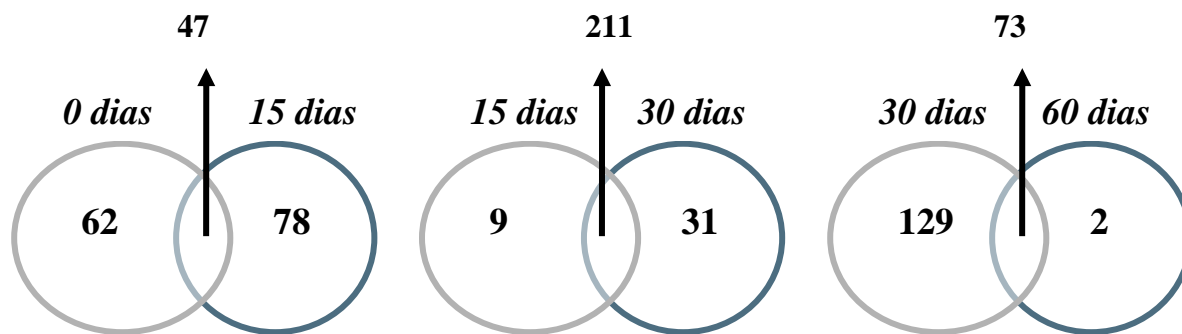


Figura 310– Número de proteínas exclusivas e constantes durante os diferentes estádios da calogênese em pupunha.

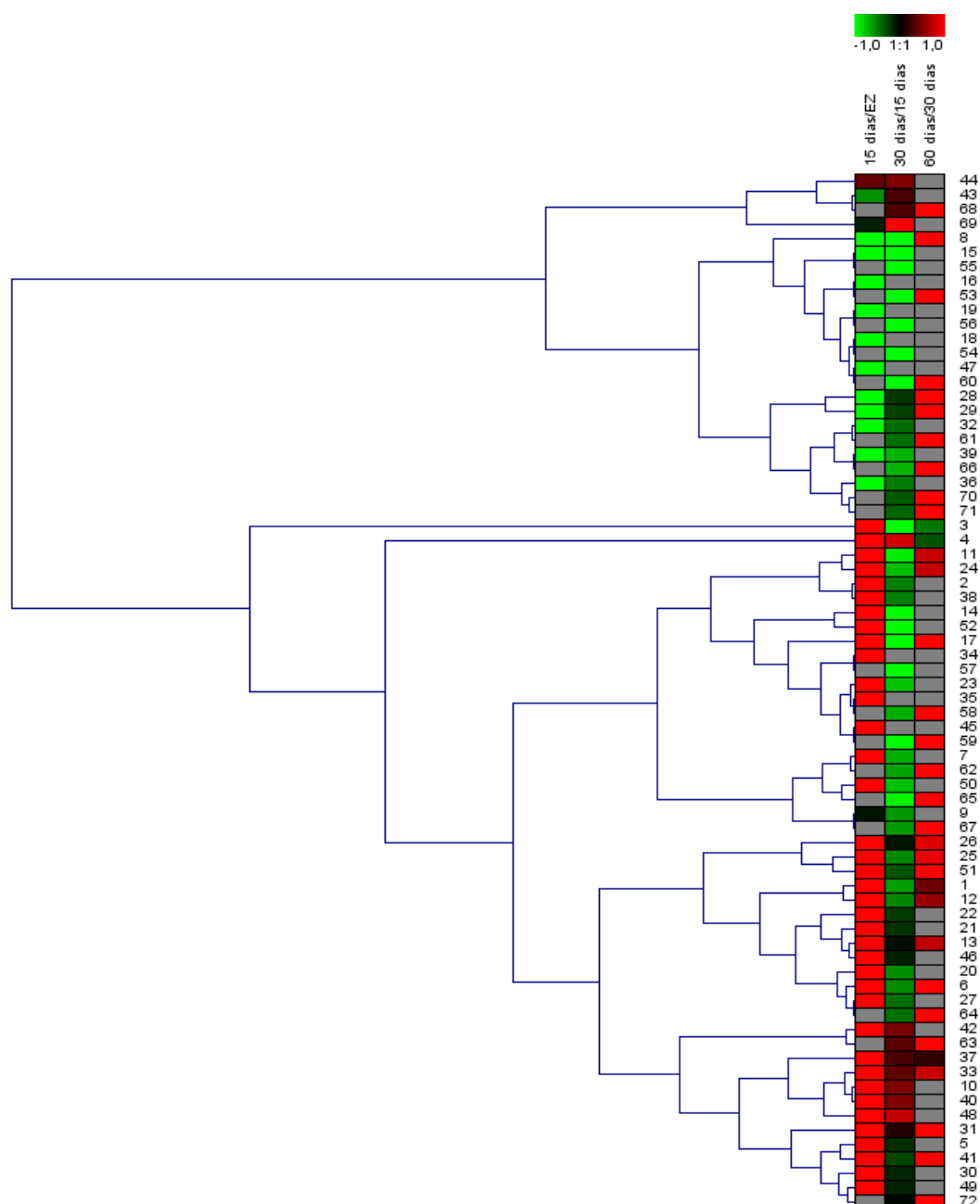


Figura 3.11 - Representação gráfica das modificações dos volumes dos spots em resposta ao desenvolvimento da calogênese. Em verde os spots que diminuem e em vermelho os que aumentam em relação ao estágio anterior.

Perfil protéico do embrião zigótico e endosperma de pupunha

De acordo com Merkle et al. (1995) a deposição de substâncias de reserva é um dos processos chaves na embriogenese zigótica. Este processo fornece os compostos que serão utilizados a partir das primeiras fases do desenvolvimento embrionário até a fase autotrófica após a germinação. Geralmente, as sementes maduras apresentam pelo menos dois ou três compostos de reserva (lipídeos, proteínas e amido). No entanto as proteínas e lipídios constituem a maior desses compostos nas sementes na maioria de espécies, armazenando principalmente nos tecidos dos endospermas (King e Gifford 1999).

As sementes analisadas no presente estudo apresentavam embriões maduros e endosperma sólido. As concentrações de proteínas totais para o embrião zigótico e o endosperma foram de 15,68 µg/g de MF (26%) e 43,97 µg/g de MF (74%), respectivamente (Figura 3.13 a). Em sementes maduras de *P. taeda* (Stone e Gifford 1997 e *A. angustifolia* (Balbuena, 2009) observaram-se resultados semelhantes, com 79% das proteínas presentes no megagametófito e 27% no embrião zigótico tardio e 75% no megagametófito e 25% no embrião zigótico tardio, respectivamente

No presente trabalho, ao comparar as concentrações totais de proteínas e a eletroforese bidimensional observou-se que apesar do endosperma apresentar uma concentração maior de proteínas totais a quantidade de proteínas expressas no gel foi inferior do que aquela observada em embriões zigóticos (Figura 3.12). Diante disso, acredita-se que as proteínas presentes no endosperma apresentem um pool menor de diversidade, podendo ser, na maioria, proteínas de reserva.

Quando comparados os perfis protéicos de embriões zigóticos e endosperma (Figura 3.12a,b), foram detectados 320 spots, sendo reprodutíveis em gel de comassie Blue ao longo de uma faixa de pH 3-10 e pesos moleculares de 6 a 190KDa. Desses spots, 239 foram detectados em embriões zigóticos e 81 em endosperma. Foram ainda observados spots exclusivos em embriões zigóticos (118), uma menor quantidade de spots exclusivos de endosperma (10) e aqueles que foram comuns em ambos (46) (Figura 3.14). Desses spots comuns, alguns tiveram diferença de expressão sendo que 10 tiveram sua expressão diminuída e três aumentada quando comparados embriões zigóticos versus endosperma (Figura 3.15)

Observou-se também uma expressão muito similar do perfil protéico entre endosperma e embrião zigótico. Isto pode refletir numa conversão mútua de proteínas e sinalização de eventos ocorridos entre embrião e o tecido circundante. Esse perfil similar

do embrião zigótico e endosperma em sementes maduras sugere que as proteínas de reserva, que serão utilizadas posteriormente para o crescimento da plântula, são acumulados tanto no embrião quanto nos tecidos do endosperma, como observado por Balbuena et al. (2009) em *Araucaria angustifolia*.

De uma forma geral as proteínas do embrião zigótico se dispuseram entre pI de 5-10 estando presente em maior quantidade em pI 7. Já, as proteínas do endosperma apresentaram-se dispostas em pI de 7- 10, diferenciando das proteínas presentes no embrião zigótico, , já que foi encontrada uma quantidade muito pequena de proteínas em pI 5 . Para PM as proteínas do E.Z. se encontraram, na sua maioria, entre 20 e 80KDa, apresentando semelhanças na disposição as proteínas do endosperma. (Figura 3.13 b,c)

Em *C. persicum*,(Winkelmann et al., 2006) foram identificadas proteínas presentes em embriões zigóticos e endosperma. Algumas dessas proteínas apresentavam pI entre 7-8 e peso molecular de 35KDa, apresentando grande similaridade para globulinas 7S. Ao observar os perfis protéicos do presente estudo (Figura 3.10) detectaram-se proteínas presentes no mesmo pI e PM, sugerindo que essas proteínas também se expressam em embriões zigótico e endosperma de pupunha.

Em *Araucaria angustifolia* as proteínas do tipo vicilina foram as mais abundantes durante a maturação do embrião zigótico, refletindo sua importância nos estádios tardios da embriogenese. Essas proteínas podem então serem consideradas como marcadoras dos estágios tardios da embriogenese zigótica nesta espécie (Balbuena et al., 2009).

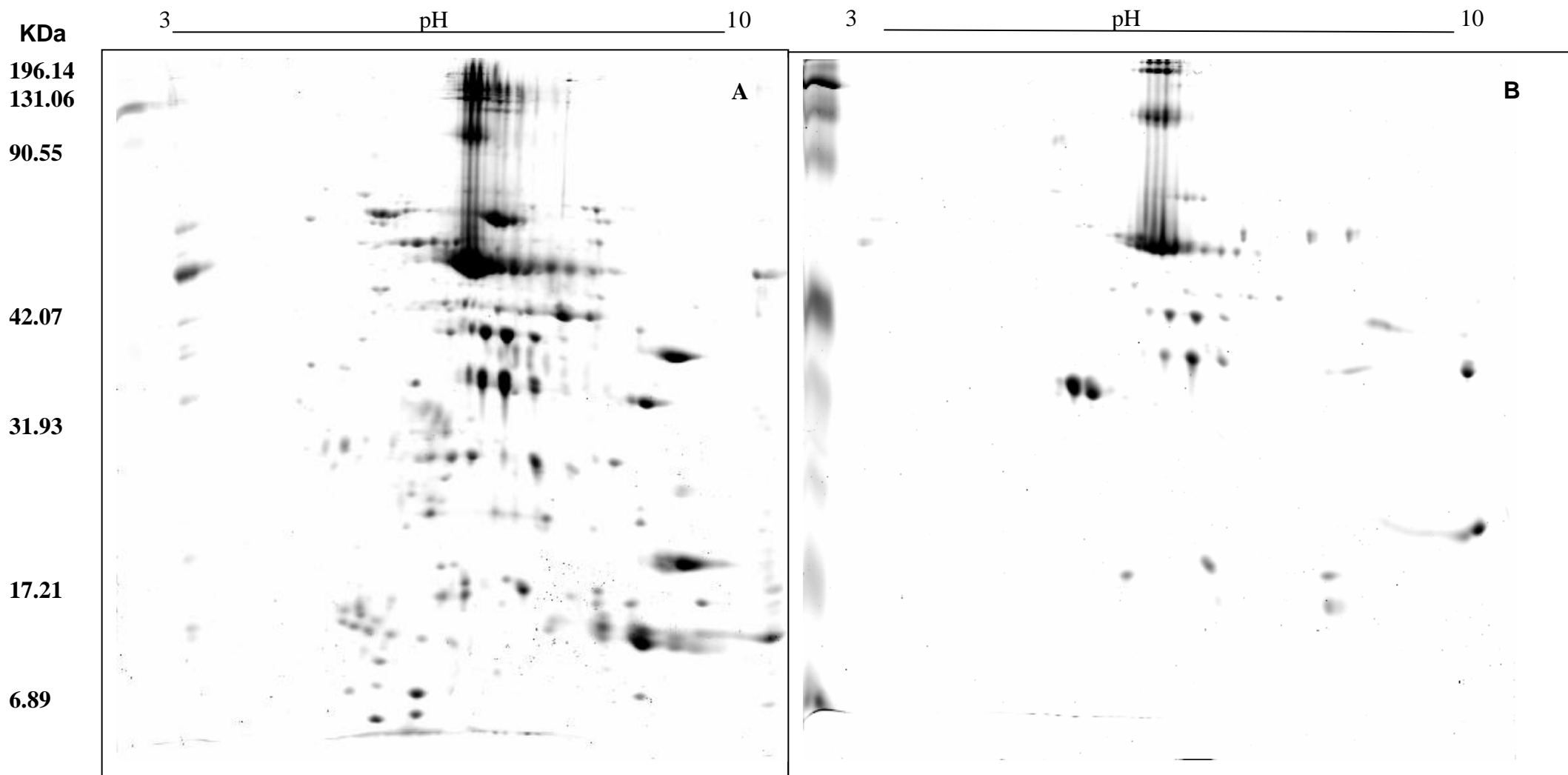


FIGURA 3.12- Perfil protéico das proteínas expressas no embrião zigótico(A) e no endosperma(B) de pupunha (*Bactris gasipaes*).

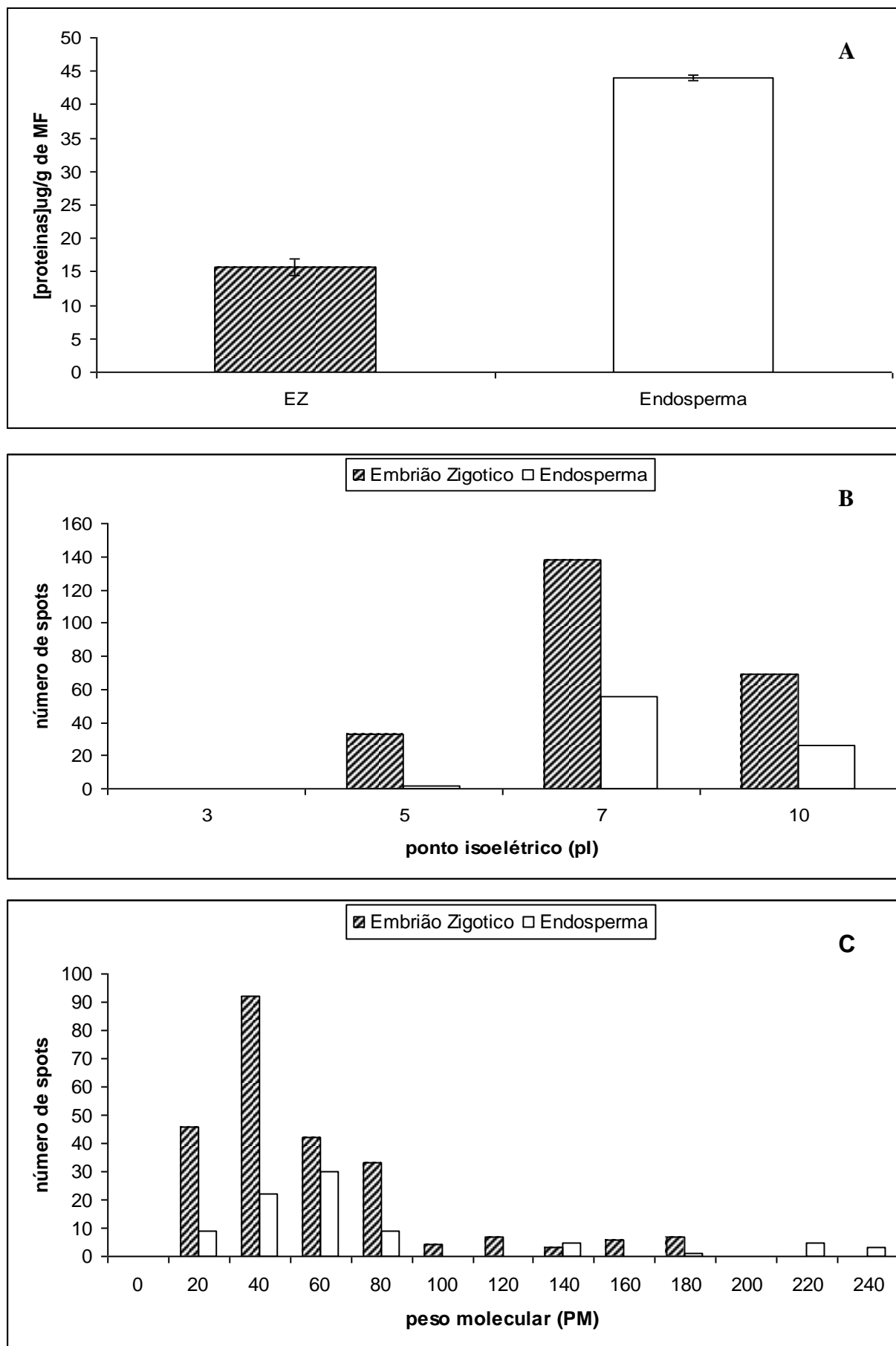


FIGURA 3.13 – **A-** Proteínas totais (ug/mg MF) em embriões zigóticos (EZ) e endosperma de pupunha. **B-** Distribuição dos pI das proteínas expressas no embrião zigóticos e endosperma. **C-** Distribuição dos e PM das proteínas expressas no embrião zigótico e no endosperma.

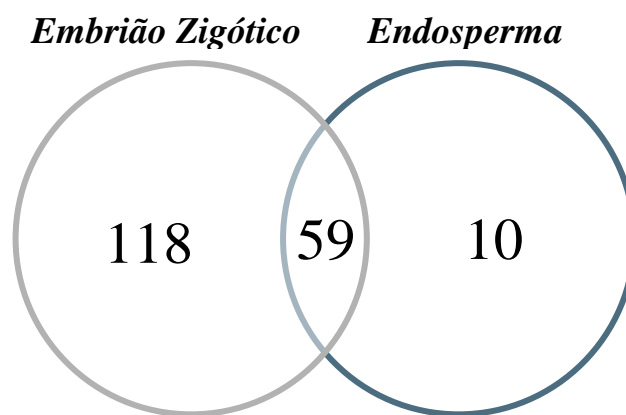


Figura 3.14 – Número de proteínas exclusivas de embrião zigótico, exclusivas de endosperma e comuns em embrião zigótico e no endosperma de pupunha.

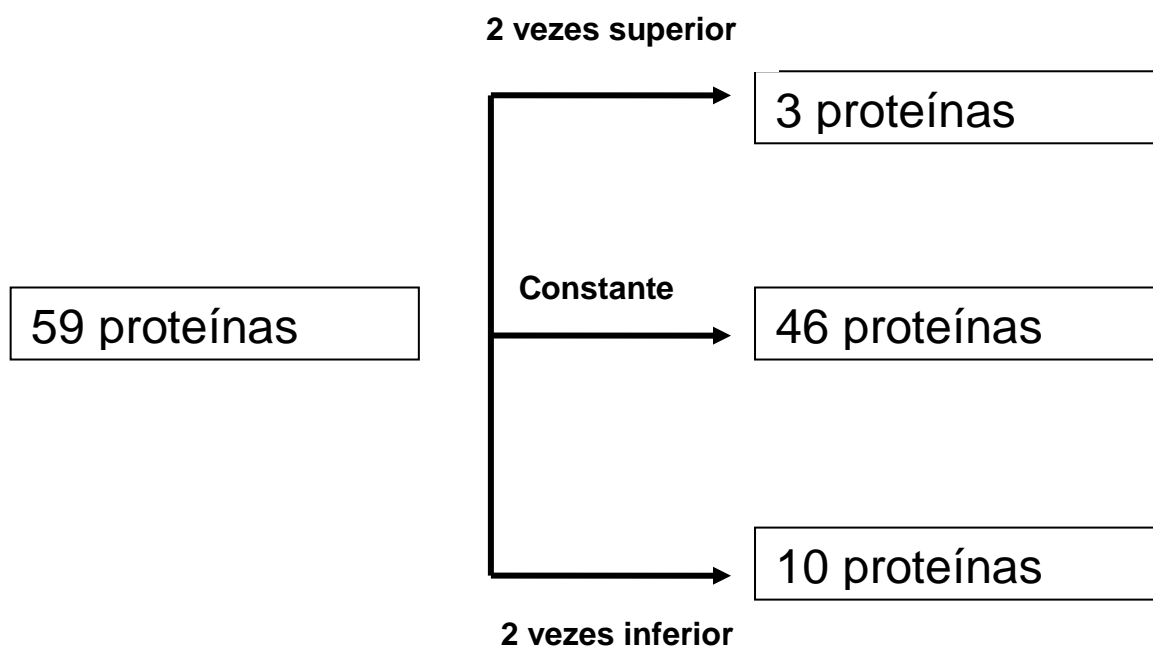


Figura 3.15- Diferença de expressão das proteínas comuns em embrião zigótico e endosperma de pupunha.

6 - Conclusões

A determinação e comparação do perfil protéico por meio das técnicas de proteômica de calos embriogênicos e não embriogênicos de pupunha ao longo dos diferentes estágios da embriogênese somática e do embrião zigótico e endosperma mostraram-se eficazes e informativas. Diferenças marcantes entre calos embriogênicos e não embriogênicos revelam proteínas candidatas a biomarcadoras da competência embriogênica dessa espécie. Diferenças na expressão de proteínas totais entre calos embriogênicos e não embriogênicos detectadas por meio de géis 2-DE revelam e identificam um maior *pool* de proteínas em calos embriogênicos. Isto sugere a ocorrência de alterações no metabolismo celular e a subsequente iniciação de um novo programa de desenvolvimento, os quais dependem da síntese de novas proteínas adequadas para garantir que suas funções sejam executadas.

Durante a calogênese, informações relevantes foram levantadas, para um melhor entendimento desse processo em *Bactris gasipaes*. Observa-se uma diferença expressiva de proteínas totais e de spots nos diferentes estádios. Durante o processo embriogênico, um aumento das proteínas do estágio inicial para os 15 dias de cultivo evidencia um incremento da atividade mitótica necessária para uma maior proliferação celular. A comparação entre calos não embriogênicos aos 45 dias e aos 60 dias revela uma semelhança quanto às proteínas entre eles. Isto indica que uma vez adquirida características não embriogênicos, esses calos mantêm seu perfil protéico. Já calos competentes mostram aumento na quantidade de proteínas aos 45 dias quando comparados ao estágio de 30 dias de cultivo.

Na comparação entre embrião zigótico e endosperma, apesar dos embriões zigóticos apresentarem um maior número de spots detecta-se uma semelhança entre os spots constantes de embrião zigótico e endosperma. Esse perfil similar indica que as proteínas de reserva que serão utilizadas posteriormente para o crescimento da plântula são acumuladas tanto no embrião quanto nos tecidos do endosperma.

7 - Perspectivas futuras.

Os resultados do presente trabalho geraram importantes informações sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos do metabolismo da embriogênese zigótica e somática de *Bactris gasipaes*. Os resultados obtidos, além de avançarem no conhecimento científico sobre aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica e somática nesta espécie, possibilitam melhorias no seu protocolo regenerativo de embriogênese somática.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de continuidade em aspectos específicos. A identificação das proteínas a ser realizada por espectrometria de massa (MS/MS), na Universidade Federal do Rio de Janeiro, com colaboração do prof. Dr. Gilberto Dumont já se encontra agendada e em seguida os dados serão processados em um banco de dados (Mascot) para subsequente identificação das mesmas. Isto permitirá um avanço significativo no trabalho e suas implicações para a embriogênese somática desta espécie.

8. Referências Bibliográficas

ALEITH, F.; RICHTER, G. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. **Planta** v. 183, p. 17–24, 1990.

BALBUENA, T.S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) **Journal Proteomic** doi:10.1016/j.jprot.2009.01.011, 2009,

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnology**, v. 17, p. 121-127, 1999.

BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; SHARMA, V.K.; KIEFT, H.; OUELLET, T.; ZHANG, L.M.; HATTORI, J.; LIU, C.M.; LAMMEREN, A.A.; MIKI, B.L.A. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell** v. 14, p. 1737–1749, 2002

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72,p.248-254, 1976

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCE, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos **Acta Physiology Plant** DOI 10.1007/s11738-008-0259-y 2009.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E. ; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: and evaluation of different methods for two – dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis— recent advances. **Current Sci** v. 86, p. 715–730, 2002.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G. Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. **Plant Science**, V. 120, p. 57-69, 1996.

FERHER, A.; PASTERNAK, T. DUDITS, D. Transition of somatic plant cell to and embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,v. 74, p. 201-228, 2003.

FITSGERALD, D. Non –two- dimensional gel electrophoresis approach for the proteomic analysis of membrane proteins. **Application Note**, p.16-17, 2001.

GIANAZZA, E. PONTI, D.E.; SCIENZA, A.; VILLA, P.; MARTINELLI, L. Monitoring by two-dimensional electrophoresis somatic embryogenesis in leaf and petiole explants from Vitis. **Electrophoresis** v.13, p. 203–209, 1992.

GIROUX, R.W.; PAULS, K.P. Characterization of somatic embryogenesis- related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Molecular Biology** v. 33, p. 393–404, 1997

GOLDBERG, R.B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science** v. 266, p. 605–614, 1994.

GUIDERDONI, E.; MEROT, B.; EKSMTRAMAGE, T.; PAULET, F.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* Species). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol 31, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds II, New York; Springer-Verlag, 1995, p. 93-113

IMIN, N. DE; JONG, F.; MATHESIU, U.; VAN NOORDEN, G.; SAEED, N.A.; WANG, X.; ROSE, R.J.; ROLFE, B.G. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. **Proteomics** v. 4 p. 1883–1896, 2004

IMIN, N.; NIZAMIDIN, M.; DANIHER, D.; NOLAN, K.E.; ROSE, R.J.; ROLFE, B.G. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6- benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. **Plant Physiology** v. 137, p. 1250–1260, 2005.

KING, J.E.; GIFFORD, D.J.; Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. **Plant Physiology** v. 113 p. 1125–1135 1997.

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, DE, GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics** v. 5, p. 461–473, 2005

MERKLE, S.A.; PARROTI, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A.(ed.); **in vitro embryogenesis in plant**. Kluwer Academic Publishers, 1995. p.155-203

MORCILO, F.; ABERLEC-BERTOSSI, F.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Accumulation of storage protein na 7S globulin during zygotic and somatic embryo development in *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36(7), p. 509-514, 1998.

MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DEVRIES, S.C. Plant embryogenesis. Review. **Crit Rev Plant Sci** 16: 535–576, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** v. 15, p. 473–497, 1962

PAN, Z.; GUAN, R.; ZHU, S.; DENG, X. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) **Plant Cell Report** v.28. p.281–289, 2009.

RANI, A.R.; REDDY, V.D.; PRAKASH. BABU, P.; PADMAJA, G. Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. **Plant Biology** v. 49, p. 347–354, 2005

SALLANDROUZE, A.; FAUROBERT, M.; EL MAATAOUI, M.; ESPAGNAC, H. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. **Electrophoresis** v. 20, p. 1109–1119 1999.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, 2004.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v.44 ,p. 147-156 2004.

STASOLLA, C.; BOZHKO, P.V.; CHU, T.M.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; SUAREZ, M.F.; CRAIG, D.; WOLFINGER, R.D.; VON ARNOLD, S.; SEDEROFF, R.R. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. **Tree Physiology** v. 24, p. 1073–1085, 2004

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE G. C. CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 2007a.

STONE, S.L.; GIFFORD, D.J.. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. I. Storage protein reserves.. **Journal. Plant Science**. V. 158, p. 727–737, 1997.

THIBAUD-NISSEN, F.; SHEALY, R.T.; KHANNA, A.; VODKIN, L.O. Clustering of Microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean **Plant Physiology** v. 132, p.118–136, 2003

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; DORSSELAER, A.V.; SEREK, M.; BRAUN, H.P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. **Planta** v. 224, p. 508–519, 2006.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell** v. 5, p.1411–1423, 1993